

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**

**A c-CrkII ADAPTER FEHÉRJE C-TERMINÁLIS  
RÉGIÓJÁNAK SZEREPE A FOKÁLIS ADHÉZIÓS  
KINÁZ JELÁTVITELI FOLYAMATAIBAN.**

**Ph.D. értekezés**

**2001**

**Zvara Ágnes**

**Szeged**

## **TARTALOMJEGYZÉK**

<b>RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK.</b>	<b>4</b>
<b>1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>6</b>
1.1. Az SH2/SH3 domént tartalmazó adapter fehérjék	6
1.2. A Crk adapter fehérjecsalád	7
1.2.1. A fehérje SH2 és SH3 domén-függő kölcsönhatásai	9
1.3. A Crk fehérje szerepe az ECM adhéziót követő jelátviteli folyamatokban.	13
1.3.1. Az integrin receptorok, a fokális adhéziós komplex.	13
1.3.2. Az integrin receptorok-ECM kölcsönhatás indukálta jelátviteli folyamatok I.: A FAK aktivációja.	14
1.3.3. Az integrin receptorok-ECM kölcsönhatás indukálta jelátviteli folyamatok II: A Crk mediált jelátviteli utak.	16
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK</b>	<b>18</b>
<b>3. ANYAGOK, MÓDSZEREK</b>	<b>19</b>
3.1. Plazmid konstrukciók	19
3.2. Sejttenyészetek, DNS transzfekció, Crk rekombináns fehérjét termelő vírusok előállítása	20
3.3. Western blot, ellenanyagok	21
3.4. Kináz aktivitás mérés	22
3.5. A sejtek fluoreszcens jelölése	22
<b>4. EREDMÉNYEK</b>	<b>24</b>
4.1. A rekombináns Crk fehérjéket kódoló plazmid konstrukciók létrehozása.	24

<b>4.2. A C-terminális Crk mutánsok hatása a p130<sup>cas</sup> <i>in vivo</i> foszforiláltsági állapotára.</b>	<b>25</b>
<b>4.3. Mi okozza a p130<sup>cas</sup> és a Crk mutánsok emelt foszfortirozin tartalmát?</b>	<b>27</b>
4.3.1. Abl kináz szerepe a CrkY <sup>222</sup> foszforilációban.	27
4.3.2. A FAK szerepének tisztázása a foszforilációban.	28
<b>4.4. A CrkΔ242<sub>EL</sub> expressziója NIH3T3 sejtekben nagymértékben emeli a FA komplexek számát.</b>	<b>30</b>
<b>4.5. A CrkΔ242<sub>EL</sub> által indukált FAK, paxillin és p130<sup>cas</sup> hiperfoszforilációt a protein foszfatáz PTP-PEST ellensúlyozza.</b>	<b>33</b>
<b>5. ÖSSZEGZÉS, TÁRGYALÁS</b>	<b>36</b>
5.1. Az eredmények összefoglalása.	36
5.2. Tárgyalás.	38
<b>6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>42</b>
<b>7. IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>43</b>
<b>9. SUMMARY.</b>	<b>49</b>
<b>10. MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ</b>	<b>53</b>
<b>11. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE</b>	<b>57</b>

## RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK.

**Abl:** Abelson nem-receptor típusú tirozin kináz

**Arg:** Abl-rokon gén által kódolt tirozin kináz

**ASV1:** Madáreredetű szarkóma vírus-1

**C3G:** Crk SH3 doménhez kapcsolódó guanin nukleotid cserét segítő fehérje.

**Crk:** CT10 kinázt szabályzó adapter fehérje (CT10 regulator of kinase).

**CT10:** 10-es számú csirke tumor

**DMEM:** Dulbecco modifikált Eagle médium

**DOCK180:** A Crk mediált jelátviteli útban a Crk után következő 180kD molsúlyú fehérje.

**ECM:** Extracelluláris mátrix

**ERK/MAP:** Extracelluláris szignál által szabályzott kináz.

**FA:** Fokális adhézio

**FAK:** Fokális adhézio kináz

**FAT:** Fokális adhézio célszekvencia (focal adhesion targeting sequence)

**GEF:** Guanin nukleotid cserét segítő fehérje (guanine nucleotide exchange faktor)

**GFP:** Zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescence protein)

**Grb2:** növekedési faktor receptorhoz kapcsolódó fehérje 2 (growth factor receptor bound 2)

**ILK:** Integrihez kapcsolt szerin-treonin kináz (integrin linked kinase)

**JNK:** c-Jun N-terminális kináz

**LIM domén:** Olyan cisztein gazdag fehérje motívum, mely egy kettős zink-finger szerkezetet határoz meg.

**Nck:** adapter fehérje

**p130<sup>cas</sup>:** 130kD molekulatömegű, a Crk-hez kapcsolódó tirozin kináz szubsztrát fehérje

**P13K:** foszfatidilinozitol-3 kináz

**Pax:** paxillin

**PTP1B:** fehérje tirozin foszfatáz 1B

**PTP-PEST:** fehérje tirozin foszfatáz PEST



**Rac1:** kis molekulatömegű GTPáz fehérje

**Rap1A/B:** kis molekulatömegű GTPáz fehérje

**Ras:** kis molekulatömegű GTPáz fehérje

**Rho:** kis molekulatömegű GTPáz fehérje

**SH2/SH3:** Src homológ 2 és Src homológ 3

**SOS:** G-fehérje guanin nukleotid cseréjét segítő fehérje (Son of sevenless)

**Src:** Szarkóma vírus fehérje tirozin kináz

**Tal:** Talin



Az SH2 és SH3 domének 100 illetve 50 aminosav hosszúságú fehérje modulok, olyan citoplazmatikus és sejtmagi fehérjék alkotórészei, melyek általában a sejten belüli szignál utak, valamint a sejtek struktúrális szerveződésének fontos elemei (Pawson *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1995). Kulcsfontosságú szerepet játszanak a szelektív és időben jól szabályzott, több fehérjét magába foglaló komplexek kialakulásában, melyek a sejtek osztódását és differenciációját irányító jeleket közvetítik.

Az SH2 domént először különböző nem-receptor típusú tirozin kinázok szabályzó régiójában azonosították (Sadowski *et al.*, 1986), majd később más, a jelátvitelben résztvevő molekulákban (PLC- $\gamma$ , RasGAP) is leírták (Matsuda *et al.*, 1990). Az SH2 domének specifikus fehérje-fehérje kölcsönhatásokban vesznek részt, ahol a kapcsolódás specifitását a foszforilált tirozin és az ezt környező egy vagy több aminosav határozza meg (Cohen *et al.*, 1995; Pawson *et al.*, 1995; Birge *et al.*, 1993).

A SH3 domén több, a tirozin kináz szignálútban résztvevő és a különböző aktivációs komplexeket alkotó fehérjékben fordul elő (Pawson *et al.*, 1995), és az SH2 doménhez hasonlóan fehérje-fehérje kölcsönhatások mediátora. A kölcsönhatás specifitását a kapcsolódó fehérje egy 10 aminosav hosszúságú prolin gazdag szekvenciája (Pro-X-X-Pro) biztosítja, mely szelektíven kapcsolódik az SH3 doménhez (Ren *et al.*, 1993). Nagyszámú SH3 kötő ligand ismert, melyek a legkülönbözőbb sejtfiziológiai folyamatokban játszanak szerepet.

## **1.2. A Crk adapter fehérjecsalád**

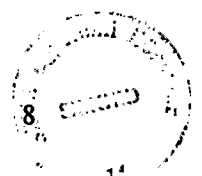
A Crk adapter fehérjék családjába három különböző (c-CrkII, c-CrkI, ill. c-CrkL) fehérje tartozik, melyek a sejtosztódás, a differenciáció, a sejtadhézió és a citoskeletális rendszer átalakításának jelátviteli folyamataiban játszanak szerepet.

A v-CrkII (vírus eredetű CrkII) volt az első SH2/SH3 domént tartalmazó adapter fehérje, melyet 1988-ban azonosítottak és klónoztak, mint új típusú, a madárereditű CT10 szarkóma vírus által kódolt fehérjét (Mayer *et al.*, 1988). Az onkogén fehérjét ezzel egyidőben egy másik madár eredetű szarkóma vírusból (ASV1) is izolálták (Tsuchie *et al.*, 1989). A név (viral CT10 regulator of kinase)

abból a tényből ered, hogy az ezzel a vírussal fertőzött sejtekben a többi sejthez képest jóval magasabb a tirozin-foszforilált fehérjék mennyisége, melyekhez a v-Crk fehérje stabilan kapcsolódik. Ez egy celluláris tirozin kináz aktivációjára, és/vagy foszfatáz inaktivációjára engedte következtetni a kutatókat. A v-Crk fehérje egy 180 bázispáros szakasza nagyfokú homológiát mutatott a foszfolipáz-C enzimmel (Mayer *et al.*, 1988), és kiderült, hogy két új, fehérjék kölcsönhatásáért felelős domént (SH2 és SH3) kódol, melyek elsődlegesen felelősek a v-Crk fehérje transzformáló tulajdonságáért.

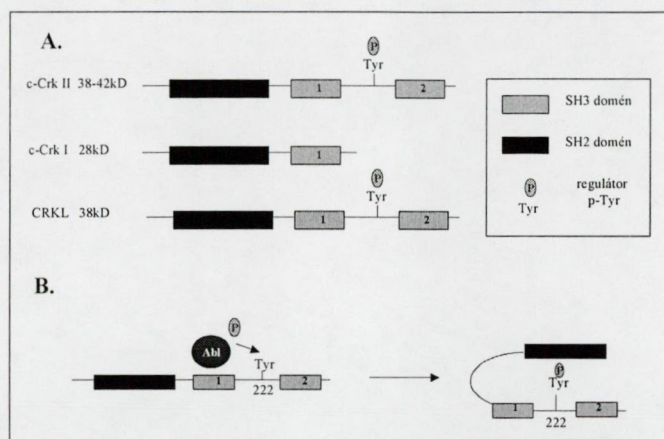
Mint sok más onkogén vírus esetében, így a CT10 és ASV1 vírusoknál is az onkogént kódoló szekvencia a természetes gazda sejtől származik. A virális p47<sup>gag/Crk</sup> géntermék egy olyan fehérje, melyben a virális Gag fehérje egy, a normális sejtekben is előforduló 28kD méretű fehérjével, a c-CrkI-gyel fúzióban található meg. A humán *crk* gén alternatív splicing révén két különböző fehérjét (c-CrkI és c-CrkII) kódol. Míg *c-crkl* expressziója néhány embrionális sejtre korlátozódik, addig a *c-crkl* expresszió az összes sejtre jellemző (Matsuda *et al.*, 1992). A c-Crk I egy SH2 és egy SH3 domént tartalmaz és mivel szerkezetileg a v-Crk-hez hasonló, túltermelődése a sejtek transzformációját okozza. A sejtekben ezen felül megtalálható egy, a c-CrkII fehérjével igen magas homológiát mutató, de külön gén által kódolt 36kD fehérje, a CrkL is, mely a legtöbb sejtben a CrkII-vel együtt fejeződik ki és az onkogén BCR-Abl által kódolt fúziós kináz legjelentősebb szubsztrátja a mieloid leukémiás betegekben (ten Hoeve *et al.*, 1994; Nichols *et al.*, 1994; Oda *et al.*, 1994).

Szerkezetileg a c-CrkII fehérje (38-42kD fajtól függően) két SH3 és egy SH2, illetve az ezeket összekötő rövid linker régióból áll (2. ábra/a.). A két SH3 domént összekötő rövid, 54 aminosav hosszú szekvencia prolinban gazdag és egy olyan aminosav motívumot tartalmaz (Y<sup>222</sup>AQP), melyben a tirozint a Abl kináz családba tartozó enzimek foszforilálják (Feller *et al.*, 1994). A pY<sup>222</sup> kötőhelyet jelent a molekula saját SH2 doménjének és lehetővé teszi a molekulán belüli kapcsolódást (Rosen *et al.*, 1995). Ez a konformációváltozás szabályozza a molekula más fehérjékkel történő kapcsolódását, represszálja a Crk-mediált jelátvitelt azáltal, hogy sztérikusan megakadályozza az N-terminális SH3 domén kapcsolódását a többi jelátvivő fehérjével. A 222 pozíciójú tirozin-fenilalanin





mutáció illetve *in vitro* protein tirozin foszfatáz PTP1B enzimmel történő kezelés a Crk fehérje ezen gátló hatását megszünteti (Okada *et al.*, 1998) (2.ábra/b.). Egy másik, funkciót befolyásoló szerkezeti elem az SH2 doménben jelenlévő prolin-gazdag régió, mely „kitüremkedve” az SH2 doménből potenciális SH3 kötőhelyként funkcionál az Abl kináz számára (Anafi *et al.*, 1996). Ez a prolin gazdag szekvencia részlet azonban az emlős és madár fehérjék között nem konzervált, szerepe ma még ismeretlen. Szintén ismeretlen a C-terminális SH3 csoport funkciója, nem azonosítottak még egy fehérjét sem, mely kölcsönhatásba lépne ezzel a csoporttal.



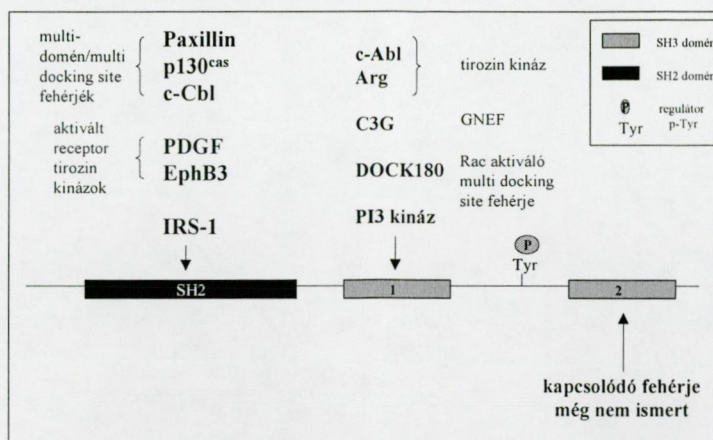
**2.ábra.** A c-Crk adapter fehérjék sematikus szerkezete és molekula tömege. A különböző Crk fehérjék szerkezete (A.) és a 222 pozíciójú tirozin foszforilációját követő, a fehérje működését szabályzó molekulán belüli SH2/pTyr<sup>222</sup> kölcsönhatás kialakulása (B.).

### 1.2.1. A fehérje SH2 és SH3 domén-függő kölcsönhatásai

Mivel a Crk fehérje önálló katalitikus aktivitással nem rendelkezik és szinte kizárólag SH2 és SH3 doménekből áll, kézenfekvő volt, hogy a kezdeti kutatások a kölcsönható fehérjék azonosítását tűzték ki célul. Az első erre irányuló kísérletek azt a tényt használták fel, hogy a Crk fehérje a transzformált sejtekben endogén kinázokat aktivál és különböző foszfortirozint tartalmazó fehérjékkel lép kölcsönhatásba. Később mutációs vizsgálatok erősítették meg, hogy ezek a fehérje



kapcsolatok az SH2 és az SH3 doménen keresztül valósulnak meg (Mayer *et al.*, 1990). A CrkII SH2/SH3 specifikus kölcsönhatásait a 3. ábra foglalja össze.



3. ábra. Összefoglaló ábra a c-Crk adapter fehérje SH2/SH3 domén specifikus kölcsönhatásairól.

SH2 domén függő kölcsönhatások: Szintetikus foszfortirozil-fehérje könyvtárral végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy az a peptid amely pTyr után +3-as pozícióban prolint tartalmazott nagy affinitással kötődött a Crk-SH2 doménhez (Songyang *et al.*, 1993). A Crk-SH2 domén erős kötődését a pTyr-X-X-Pro szekvenciához később az is bizonyította, hogy különböző, sejten belüli Crk-SH2 kölcsönható fehérjét izoláltak, melyek ezt a szekvenciát több kópiában is tartalmazták (Birge *et al.*, 1993). Az SH2 csoport a foszforilált tirozint megfelelő szekvenciában (Tyr-X-X-Pro) tartalmazó, a fokális adhézións komplexben jelenlevő fehérjékkel kapcsolódik, melyek közül a jelen dolgozat két fehérjével (paxillinnel és a p130<sup>cas</sup>) foglalkozik részletesen.

Az első Crk-SH2 kölcsönható fehérje, melyet azonosítottak a paxillin volt, mely a v-Crk transzformált sejteken pTyr ellenanyaggal végzett Western blot kísérletekben a 70-90kD és a 120-140kD molsúly tartományban igen erős jelet adott. Koimmunoprecipitációs vizsgálatok azt mutatták, hogy a v-Crk fehérjéhez stabilan asszociálódik (Birge *et al.*, 1993). A paxillin 561 aminosav hosszúságú, 70kD molsúlyú fehérje, mely több SH2 domén-kötő foszfortirozint, SH3 domén-kötő prolin gazdag régiót és 4 LIM domént tartalmaz (a LIM domén olyan cisztein

gazdag fehérje motívum, mely egy kettős zink-finger szerkezetet határoz meg) (Turner *et al.*, 1994; Schmeichel *et al.*, 1994). A fehérje a legkülönbözőbb sejten érő ingerre foszforilálódik, majd a sejten belüli citoszkéletális strukturákkal, elsősorban a fokális adhézión (FA) komplexszel kapcsolódik LIM doménjein keresztül (Dawid *et al.*, 1998). Mivel saját enzimaktivitással nem rendelkezik, általánosan elfogadott az a nézet, hogy „kihorgonyzó” (scaffold) fehérjeként funkcionál a FA komplex és más, a citoszkélethez kapcsolódó szerkezeti és jelátvivő fehérjék között. Az integrin receptorok aktivációját követően a paxillin kapcsolódik az aktivált receptorhoz, majd a tirozin kinázok (FAK vagy Src) a Y<sup>118</sup> tirozint foszforilálják, mely kötőhelyet biztosít a Crk-SH2 doménnek (Schaller *et al.*, 1995). Nem teljesen tisztázott ennek a kölcsönhatásnak a további jelátviteli folyamatokban való szerepe, bár a Y118F mutáns paxillinnel végzett kísérletek a sejtek fibronectin adhéziójában betöltött szerepére világítanak rá (Brown *et al.*, 1998). A paxillin közvetlen kölcsönhatása a PTP-PEST tirozin foszfatázzal, majd ezt követően a paxillin és a hozzá kapcsolódó fehérjék defoszforilációja a paxillin-mediált jelátviteli utak fontos negatív szabályzó eleme (Shen *et al.*, 1998).

A másik jelentős Crk-SH2 kölcsönható fehérje a Crk-asszociált tirozin kináz szubsztrát, a 130kD molsúlyú p130<sup>cas</sup>, melyet nem sokkal a paxillin után klónoztak. (Sakai *et al.*, 1994) A paxillinhoz hasonlóan a p130<sup>cas</sup> is különféle onkogén tirozin kinázok célpontja (Nojima *et al.*, 1996). Szerkezetéből adódóan (SH3 domén és 15 kópia pTyr-X-X-Pro szekvencia részlet) az ún. nagy multidocking fehérjékhez tartozik, mivel többszörös kópiában tartalmazza a Crk-SH2 domén-specifikus pTyr-X-X-Pro szekvenciát. A 15 kópia pTyr-X-X-Pro motívum a 213 és 511 aminosavak közötti „szubsztrát régióban” koncentrálódik, mely foszforiláció után a Crk/CRKL illetve Nck SH2 domének kapcsolódási pontjául szolgál (Mayer *et al.*, 1995). Az integrin szignálútban betöltött szerepére utal az a tény, hogy az SH3 doménjén keresztül közvetlenül köti a FAK kinázt és az integrin aktivációt követően foszforiláltsága a FAK és Src enzimek aktivitása révén nagymértékben megnő. A p130<sup>cas</sup> foszforilációját az integrin mediált FAK aktiváción kívül mitogén szignálok, bombesin, vasopressin (Zachary *et al.*, 1992) is okozhatja. SH3-doménje ezen felül PTP-PEST tirozin foszfatáz számára is lehetőségeket kínál a kölcsönhatásra. A PTP-PEST hatására a p130<sup>cas</sup>

defoszforilálódik, ami a p130<sup>cas</sup>-mediált jelátviteli utak „kikapcsolását” okozza (Garton *et al.*, 1996). A speciális domén struktúra támasztja alá azt a hipotézist, hogy a p130<sup>cas</sup> egy különleges, sejten belüli „találkozási pont”-ként funkcionál, s ezáltal lehetővé teszi a FA komplex és a hozzá hasonló sejtstruktúrák által közvetített különböző jelátviteli utak egymás közti kommunikációját.

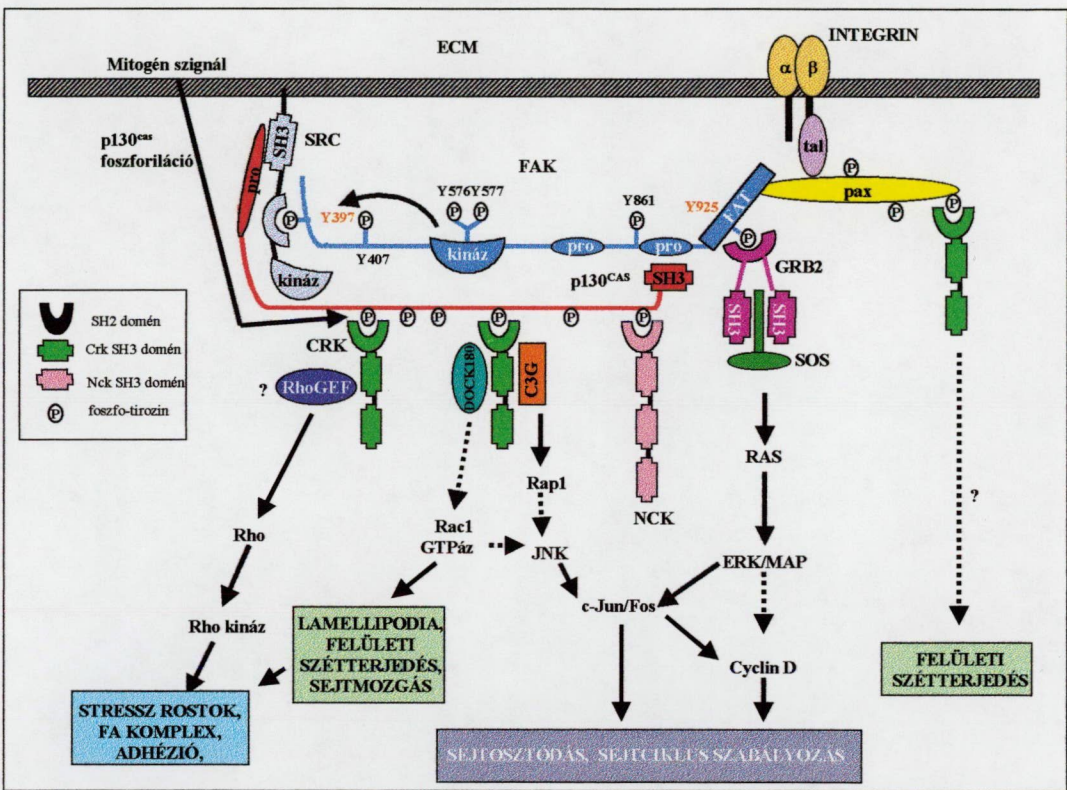
SH3 domén függő kölcsönhatások: Ahhoz, hogy a Crk fehérje pontos szerepe a jelátviteli utakban tisztázódjon, elengedhetetlen az SH3 doménekkel kölcsönható fehérjék azonosítása, funkciójuk tisztázása. Az első azonosított fehérjék, melyek az N-terminális SH3 doménnel lépnek kölcsönhatásba, a c-Abl tirozin kináz (Ren *et al.*, 1994), a C3G, egy a GDP/GTP cserét segítő (guanin nucleotide exchange, GNEF) fehérje (Tanaka *et al.*, 1994) a DOCK180 (protein downstream of Crk with 180kD) (Feller *et al.*, 1995) és a foszfatidil inozitol-3, PI3, kináz (Gesbert *et al.*, 1998) volt. Mind a mai napig csak olyan fehérjék ismertek, melyek az N-terminális SH3 doménhez kapcsolódnak, a C-terminális SH3 domén szerepe ismeretlen. A kötődés specificitását a kapcsolódó fehérjékben több kópiában is előforduló konszenzus szekvencia, a Pro-x-(Leu)-Pro-x-Lys biztosítja. A Lys→Arg aminosav csere ugyan még lehetővé teszi a kötődést, de az affinitás erőssége jelentősen csökken (Knudsen *et al.*, 1995).

Míg v-Crk fehérje *in vivo* stabilan kötődik a c-Abl tirozin kinázhoz, mely fontos szerepet játszhat a Crk mediált sejtttranszformációban, addig a c-Crk kiváló *in vitro* szubsztrátként bizonyult a c-Abl és a rokon c-Arg (Abl related gene) kinázoknak (Feller *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996). A C3G fehérjét fág expressziós könyvtárból izolálták mint a Crk N-terminális SH3 doménhez specifikusan kapcsolódó fehérjét (Tanaka *et al.*, 1994), mely szoros homológiát mutatott az ismert nukleotid „felszabadító” (nucleotide release) fehérjékkel, majd később kimutatták, hogy a Rap1A és Rap1B GTP hasító enzimek szelektív aktivátorai (van den Berghe *et al.*, 1997). A DOCK 180 fehérjét a Crk N-terminális SH3 doménhez specifikusan kötődő fehérjeként mutatták ki, s nem sokkal később meg is klónozták (Feller *et al.*, 1995, Hasegawa *et al.*, 1996). Ma még tisztázatlan, hogy a fehérje szerepét a jelátviteli kaszkádfolyamatban a Crk „előtt”, vagy „után” látja el.



### 1.3. A Crk fehérje szerepe az ECM adhéziót követő jelátviteli folyamatokban.

A Crk fehérje szerepe a sejtet ért külső ingerek által aktivált szignálutakban igen sokrétű, magában foglalva a növekedési faktorok (NGF, EGF), mitogén lipidek, citokinek által aktivált, a T és B sejt receptor aktivációt, valamint extracelluláris matrix (ECM) adhéziót követő jelátviteli folyamatokat. (Feller *et al.*, 1998). Ez a dolgozat a CrkII szerepét az ECM adhézió utáni integrin aktivációt követő jelátviteli folyamatokban elemzi bővebben, melyekről a 4.ábra nyújt áttekintést.



4.ábra. CrkII szerepe az ECM adhézió utáni integrin aktivációt követő jelátviteli folyamatokban.

#### 1.3.1. Az integrin receptorok, a fokális adhéziós komplex.

Az adherens sejteknek a túléléshez szükségük van az ECM fehérjékkel történő kölcsönhatásra, mely a szilárd felülethez történő tapadásukat biztosítja. Az

integrin heterodimer receptor család tagjai transzmembrán hidat alkotnak az ECM fehérjék és a citoszkeleton aktin filamentjei között, szabályozva ezzel a sejtek tapadását az ECM-hoz, valamint az ehhez kapcsolódó sejtosztódást, differenciálódást vagy apoptózist irányító jelátviteli folyamatokat. (Keely *et al.*, 1998).

Az integrin receptorok extracelluláris stimulus hiányában diffúzan helyezkednek el a sejtfelszínen és nem kapcsolódnak a citoszkeletonhoz. Kapcsolódásuk az ECM fehérjékkel mint pl. a fibronektin, vitronektin, kollagén  $\beta$  alegység konformáció változását okozza, mely lehetővé teszi a sejten belüli szerkezeti fehérjékkel, pl. talin, vinculin, paxillin való direkt vagy indirekt kölcsönhatást, az aktin polimerizációt és az integrinek egymás melletti csoportokba rendeződését (Felsenfeld *et al.*, 1996). A Rho GTPáz aktivációjára a kisebb aktin filamentek egyre nagyobb aktin rostokká rendeződnek, s pozitív visszacsatolással tovább segítik az egyre nagyobb integrincsoportok kialakulását, melynek következtében egy jól szervezett, immunfluoreszcens jelölés után mikroszkóppal jól látható, az integrineket és a sejten belüli fehérjéket magába foglaló citoskeletális struktúra, a fokális adhézión (FA) komplex jön létre (Burridge *et al.*, 1996). A FA komplexben az integrin transzmembrán fehérjék, a sejt szerkezeti- $(\alpha)$ -aktin, vinculin, talin) és jelátvivő fehérjéi (pl. FAK, Crk, p130<sup>cas</sup>) jól definiált rendszer szerint kapcsolódnak. A FA komplexet alkotó fehérjék dinamikus kapcsolatát és ezen keresztül a FA komplexek létrejöttét illetve szétesését a sejtekben működő kinázok és foszfatázok működésének mindenkor egyensúlya biztosítja, lehetővé téve a citoskeletális rendszer dinamikus újrendeződését (Burridge *et al.*, 1996).

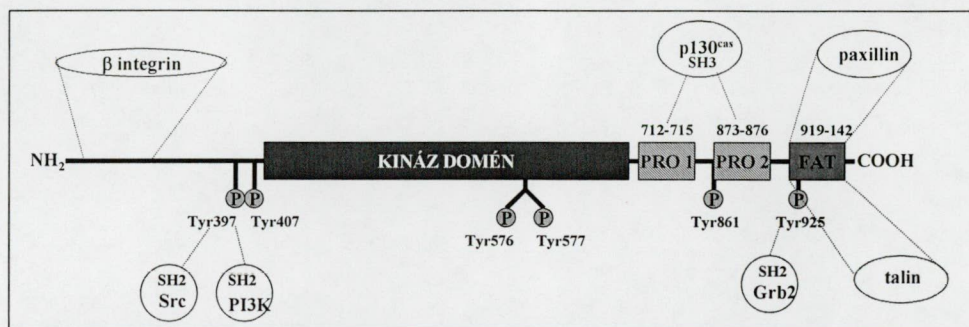
### 1.3.2. Az integrin receptorok-ECM kölcsönhatás indukálta jelátviteli folyamatok

#### I.: A FAK aktivációja.

Mivel az integrin receptorok nem rendelkeznek önálló katalitikus aktivitással, a FA komplexekhez direkt vagy indirekt módon kapcsolódó, sejten belüli tirozin kinázok, mint pl. a Src, az Abl, a FAK, az integrinhez kapcsolt szerin-treonin kináz ILK (Wary *et al.*, 1996) közvetítik a receptor indukálta



jeleket. Ezen nem receptor típusú kinázok közül a legjelentősebb a FAK (Schaller *et al.*, 1994)(5.ábra). A többi ismert citoszolikus tirozin kinázzal ellentétben a FAK nem tartalmaz SH2 ill. SH3 doméneket, viszont több olyan prolin gazdag régiót és foszfotirozint tartalmaz, melyek más fehérjék SH2 és SH3 doménjeinek kapcsolódási pontot kínálnak. A fehérjén máig összesen hat tirozint azonosítottak, mint foszforilációs helyet (5.ábra). A FAK/ $\beta$  integrin citoplazmatikus lánc kapcsolat egy köztes kapcsoló fehérjén, a talinon vagy a paxillinon keresztül jön létre (Chen *et al.*, 1995; Burridge *et al.*, 1992). A FAK/paxillin illetve talin kapcsolathoz a FAK C-terminális végén található FA cél szekvencia (FAT) szükséges (5.ábra) (Hildebrand *et al.*, 1995).



**5.ábra.** A FAK szerkezete. Az ábra feltünteti a hat ismert *in vivo* tirozinfoszforilációs helyet, a két prolingazdag régiót, a FAT (fokális adhézión target) szekvenciát és a hozzájuk kapcsolódó SH2, SH3 domént tartalmazó fehérjéket.

Az FAK aktivációját követően a fehérje legjelentősebb tirozinja, a Y<sup>397</sup>, autofoszforilálódik (Schaller *et al.*, 1995), és mind a Src és Fyn kináz SH2 doménjének, mind a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) számára kapcsolódási pontot biztosít (Schaller *et al.*, 1994). A Src kináz kapcsolódása a FAK-hoz a molekula további tirozin foszforilációját okozza. Az ismert hat tirozin közül csak a Y<sup>397</sup> az, amelyre a foszfátcsoport egyértelműen a FAK autofoszforiláló aktivitása révén kerül, a többi tirozint a Src kináz foszforilálja. A FAK kináz doménjében levő tirozinok, a Y<sup>577</sup> és a Y<sup>576</sup> foszforiláltsága az enzimaktivitást pozitívan befolyásolja, a Y<sup>397</sup> a Src és a PI3K, a Y<sup>925</sup> pedig a Grb2 kapcsolódását teszi lehetővé. A Y<sup>407</sup> és a Y<sup>861</sup> szerepe nem ismert.

### 1.3.3. Az integrin receptorok-ECM kölcsönhatás indukálta jelátviteli folyamatok

#### II: A Crk mediált jelátviteli utak.

A Src kináz, illetve a Src/FAK-kinázok együttesen a hozzá kapcsolódó FA szerkezeti fehérjét (pl. tensin) és az adapter p130<sup>cas</sup> fehérjét is foszforilálják. A p130<sup>cas</sup> és a paxillin foszfortirozinjai kapcsoló helyet hoznak létre a két adapter fehérje, a Crk és a Nck számára, lokalizálva ezzel a Crk jelátviteli utat a FA komplexekhez. A Crk fehérjéhez kapcsolódó molekulák, a C3G, DOCK180 az Crk-SH3 doménen keresztül így szintén a FA komplexhez kapcsolnak (4.ábra).

JNK aktiváció, sejtosztódás szabályozás: A Crk mind a C3G fehérjén (Tanaka *et al.*, 1998), mind a DOCK180/Rac komplexen (Dolfi *et al.*, 1998) keresztül résztvesz a c-Jun NH<sub>2</sub>-terminális kináz (JNK) aktivációjában, mely bejutva a sejtmagba foszforilálja a c-Jun-t, majd a c-Jun/c-Fos komplex (AP-1 transzkripciós faktor) a sejtosztódáshoz szükséges korai gének átírását szabályozza.

Sejtmozgás, citoskeleton átrendeződés, sejtek felületi szétterjedése: A sejtmozgáshoz a citoskeleton, az aktin-miozin motor időben és térben történő folyamatos újrendeződésére van szükség. Az ezeket a folyamatokat irányító különböző jelátviteli utak és egymással való kapcsolatuk ma még pontosan nem ismert. A sejtmozgást az ECM adhézió/integrin kapcsolat és a növekedési faktor/receptor komplex által aktivált intracelluláris jelátviteli utak indítják el. A növekedési faktor/receptor komplex által aktivált MAPK foszforilálja a miozin könnyű lánc-kinázt (MLCK), ami miozin foszforilációhoz és az aktin-miozin motor kialakulásához vezet, lehetővé téve a mozgáshoz szükséges kontrakciót (Stupack *et al.*, 2000). Az ECM adhézió/integrin kapcsolat a FAK/Src komplexet aktiválja, ami a p130<sup>cas</sup> foszforilációjához vezet. A p130<sup>cas</sup>/Crk komplex a DOCK180 effektor fehérjén keresztül aktiválja a Rac GTPáz (Kiyokava *et al.*, 1998), s ezáltal „molekuláris kapcsolóként” működik az aktin polimerizációban (Klemke *et al.*, 1998). Mind a növekedési faktor/receptor komplex, mind a ECM adhézió/integrin kapcsolat által aktivált jelátviteli út szükséges a sejtmozgás irányításához. Az integrinek FAK/p130<sup>cas</sup>/Crk komplexen egy másik, a

citoszkeleton-átrendeződést, a FA komplexek kialakulását és érését, valamint a felületi szétterjedést irányító kis molekulatömegű GTPáz, a Rho-t is aktiválják. A pontos jelátviteli út nem ismert, de a folyamatban valószínűleg egy, még azonosítatlan Rho GEF fehérjének is szerepe van. Bár ez a fejezet a FAK aktivációt követő Crk mediált jelátviteli utakat taglalta, több irodalmi adat támasztja alá azt a tényt, hogy a Crk egy visszacsatoló mechanizmuson keresztül aktiválhatja a FAK-t. A v-Crk transzformált sejtekben az onkogén *crk* emeli a FA fehérjék foszfortirozin szintjét és a FAK aktivitását. Mindez azt mutatja, hogy a Crk mind a FAK előtti, mind a FAK utáni jelátviteli jeleket befolyásolja (Polte *et al.*, 1995).

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Annak ellenére, hogy már sok olyan fehérjét azonosítottak, melyek a Crk N-terminális SH3 doménjével lépnek kölcsönhatásba, a Crk C-terminális SH3 domén esetében nem sikerült azonosítani egy kölcsönható fehérjét sem. A fehérje ezen részének funkciója mind a mai napig ismeretlen. Annak érdekében, hogy több információt kapjunk a Crk C-terminális régióinak illetve a két SH3 domént összekötő linkerrégióinak a fehérje működésében és a FAK mediált jelátviteli folyamataiban betöltött szerepéről, célul tűztük ki, hogy:

1. különböző, a C-terminális SH3 domént, illetve a két SH3 domént összekötő linker régiót érintő pont és deléciós mutánst állítunk elő.
2. vizsgáljuk ezen mutások hatását a FA komplexet alkotó FAK, paxillin és p130<sup>cas</sup> fehérjék foszfortirozin szintjére.
3. vizsgáljuk a Src, Abl és FAK kinázok illetve a PTP-PEST, PTEN foszfatázok szerepét a folyamatban.
4. vizsgáljuk a mutások szerepét az NIH3T3 fibroblaszt sejtek FA komplexeinek kialakulásában.

### 3. ANYAGOK, MÓDSZEREK

#### 3.1. Plazmid konstrukciók

A tirozin specifikus PTEN foszfatázt a pFLAG-CMV-2 (Kodak) (köszönet Dr. Maria Georgescunak, The Rockefeller University), a PTP-PEST foszfatázt (Dr. M. Trembley, McGill University) a pcDNA emlős expressziós vektor kódolta. A FLAG-tagged paxillin, GST-p130<sup>cas</sup>, kináz deficiens Abl (K290M) és a kináz deficiens Src plazmid konstrukciók leírását egy korábbi közlemény tartalmazza (Escalante *et al.*, 2000).

A vad típusú c-CrkII fehérjét a pEBB emlős expressziós vektor kódolta. A deléciós CrkII mutánsokat, CrkΔ212, CrkΔ222, CrkΔ232, CrkΔ242 és CrkΔ255 polimeráz lánc reakcióval (PCR), szintetikus primerek (forward primer 5'-CCG GGG ATG GAT CCG CGG GCA GTT CGA CTC CGA AGG-3' illetve a megfelelő reverz primerek, melyek terminációs kodont tartalmaztak) segítségével hoztuk létre. Templátként a vad típusú CrkII plazmidot használtuk.

A pEBB-CrkΔ242<sub>EL</sub> konstrukciót a forward 5'-CCG GGG ATC CAT GGC CGG GCA GTT CGA CTC CGA GG-3' és a reverz 5'-GGC CGC GGC CGC CCC GGG CAT AAA AAG GGC CAT TCT G-3' primerek felhasználásával PCR reakcióval klónoztuk. A forward primer *Bam*HI, a reverz primer *Not*I restrikciós enzim felismerő helyet tartalmazott. Az amplifikált fragmentet agaróz gélelektroforézis után QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) segítségével tisztítottuk és *Not*I and *Bam*HI enzimmal emésztett pEBB expressziós vektorba ligáltuk. Minden mutáns konstrukciót szekvenálással ellenőriztünk.

A pCX-CrkΔ242<sub>EL</sub>-GFP és pCX-CrkII-GFP rekombináns retrovírus konstrukciókhoz a pEBB-CrkΔ242<sub>EL</sub> és a pEBB-CrkII plazmidokat *Not*I-*Bam*HI enzimekkel emésztettük, majd az 5' túlnyúló végeket Klenow polimeráz enzimmal feltöltöttük és *Eco*RI emésztett/Klenow kezelt pCX-GFP (köszönet Tsuyoshi Agatinak, Osaka Bioscience Institute) vektorba ligáltuk. A Crk expressziót a retrovirális long terminal repeat (LTR) és CMV promoter kontrolálja. A zöld fluoreszkáló fehérje (GFP) a Crk fehérjékkel azonos

transzkriptumról íródik át a klónozó vektorban jelenlévő belső riboszómakötő hely (internal ribosome entry site, IRES) segítségével.

### **3.2. Sejttenyészetek, DNS transzfekció, Crk rekombináns fehérjét termelő vírusok előállítása**

Sejttenyésztés: A humán embrionális vese (HEK) 293T és a Bosc23 (Retromax<sup>TM</sup>, Imgen) sejtvonalat Dulbecco's modified Eagle's mediumban (DMEM) tenyésztettük 10% fetal calf serum (FCS), 100U/ml penicillin és streptomycin jelenlétében. Az NIH3T3 sejteket DMEM médiumban tenyésztettük 10% calf serum és antibiotikum jelenlétében. Minden sejtvonalat 37C<sup>0</sup>-on, párás környezetben, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében tartottuk fent.

DNS transzfekció, Crk rekombináns fehérjét termelő vírusok előállítása: A tranziens expresszióhoz 0.5X10<sup>6</sup> 293T sejtet 6cm-es sejttenyésztő Petri-csészékbe oltottuk és különböző mennyiségű plazmid DNS-sel transzfektáltuk Lipofectamine (Boehringer) módszerrel. 48 órás 37C<sup>0</sup>-on történő inkubálás után a sejteket jéghideg PBS pufferrel mostuk majd lizáltuk. NIH3T3 sejteket pCX-CrkII-GFP expressziós vektorral transzfektáltuk majd a zöld festődés alapján a zölden festődő sejtpopulációt FACStarPlus (Benton Dickinson, Inc.) sejtszorterrel szétválasztottuk és Western blot technikával anti-CrkII és anti-GFP ellenanyagokkal demonstráltuk az együttes expressziót.

A Crk expresszáló vírusrészecskék előállításához a pCX-CrkΔ242<sub>EL</sub>-GFP és a pCX-CrkII-GFP plazmid DNS-t a pCL-Eco (Imgenex) plazmiddal, mely tartalmazza a *gag*, *pol*, és *Ecotrophic gp70* vírus fehérjét, 1:1 arányban kotranszfektáltuk 50% konfluens Bosc23 sejtekbe Lipofectamine módszerrel, szérummentes OptiMEM (Gibco BRL) tápoldatban. 4 órás inkubálás után a kotranszfekciós elegyet 10ml 10% FCS-t tartalmazó DMEM tápoldattal cseréltük le és 48 óráig inkubáltuk. A vírust tartalmazó felülúszót összegyűjtöttük, 0.48μm pórus méretű filteren (Millipore) átszűrtük és 40% konfluens NIH3T3 sejtekhez adtuk 5μg/ml Polybrene (Sigma) jelenlétében.



### 3.3. Western blot, ellenanyagok

Sejtlízis, PAGE: A sejtlízis jéghideg HNTG pufferben (20M HEPES, 150mM NaCl, 10% glicerin, 1% Triton-X-100 pH.: 7.5, 0.1mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1% Aprotinin, 1mM PMSF, 5µg/ml Leupeptin.) 15 percig jégen történt. A lizátumot 5 percig 4C<sup>0</sup>-on centrifugáltuk 13.000 r.p.m. sebességgel. Az összfehérje koncentrációt a Bio-Rad protein assay kittel határoztuk meg. Az azonos mennyiségű sejtlizátumokat SDS-t tartalmazó minta pufferben 5 percig forraltuk és 8% vagy 10%-os SDS-polyacrylamid gélen elektroforézis segítségével (PAGE) elválasztottuk.

A koimmunoprecipitációs vizsgálatokhoz azonos mennyiségű (500µg) totál fehérje mennyiséget az elsődleges ellenanyaggal 4C<sup>0</sup>-on 3 órát majd, nyúlban termeltetett egér ellenanyaggal illetve Protein A Sepharose-zal (Pharmacia) 1 órán keresztül inkubáltuk. A Sepharose gyöngyöt az elektroforézis előtt alacsony detergens koncentrációjú HNTG lízis pufferrel (0.1% Triton-X-100) háromszor mostuk.

Western blot analízis: A Western blot analízishez a sejtlizátumokat illetve az immunkomplexeket SDS-PAGE elektroforézissel elválasztottuk és PVDF membránra (Millipore) elektro-blottoltuk. A membránt 1% BSA-t tartalmazó TBS-ben (Tris-buffered saline) blokkoltuk és 3 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk az alábbi elsődleges ellenanyagokkal: anti-Crk-SH2-RF51, anti-PTP-PEST, anti-pTyr 4G10 (0.1µg/ml), anti-Flag (0.1µg/ml), anti-p130<sup>cas</sup> (0.25µg/ml), anti-Paxillin (0.1µg/ml), anti-FAK anti-GFP anti-pCrk 1:1000 hígításban. A membránt háromszor mostuk 0.02% Tween 20 detergenst tartalmazó TBS pufferben, majd HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) 1:5000 (0.02µg/ml) hígításban egy órán keresztül inkubáltuk. Az immunreaktív fehérje csíkokat Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL) (Amersham) segítségével detektáltuk.

Ellenanyagok: Anti-Crk-SH2 (RF51) (Knudsen *et al.*, 1994) a CrkII és a

C-terminális deléciós mutáns detektálására. **Anti-PTP-PEST** (CSH8 pAb) (Nick Tonks, CSHL) (Garton *et al.*, 1997), **anti Crk-pY<sup>222</sup>** (Michiyuki Mathsuda, NIH Tokyo, Japan) (Hashimoto *et al.*, 1998), **anti-FAK és anti-p130<sup>cas</sup>** (Transduction Laboratories), **anti-pTyr 4G10** (Upstate biotechnologies), **anti-GFP** (NE Biolabs), **anti-Paxillin** (Zymed), **foszfo-specifikus anti-FAK** (Biosource)

### 3.4. Kináz aktivitás mérés

A c-Abl immunkomplexek kinázaktivitásának megállapításához a komplexeket [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP és GST-Crk 120-225 (Escalante *et al.*, 2000) hozzáadásával 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, az SDS-PAGE elektroforézis előtt SDS mintapufferben forraltuk. A gélt 50% metanol/10% ecetsavban fixáltuk és autoradiografáltuk. A mennyiségi analízis Molecular Dynamics Phospho-Imager-rel történt.

### 3.5. A sejtek fluoreszcens jelölése

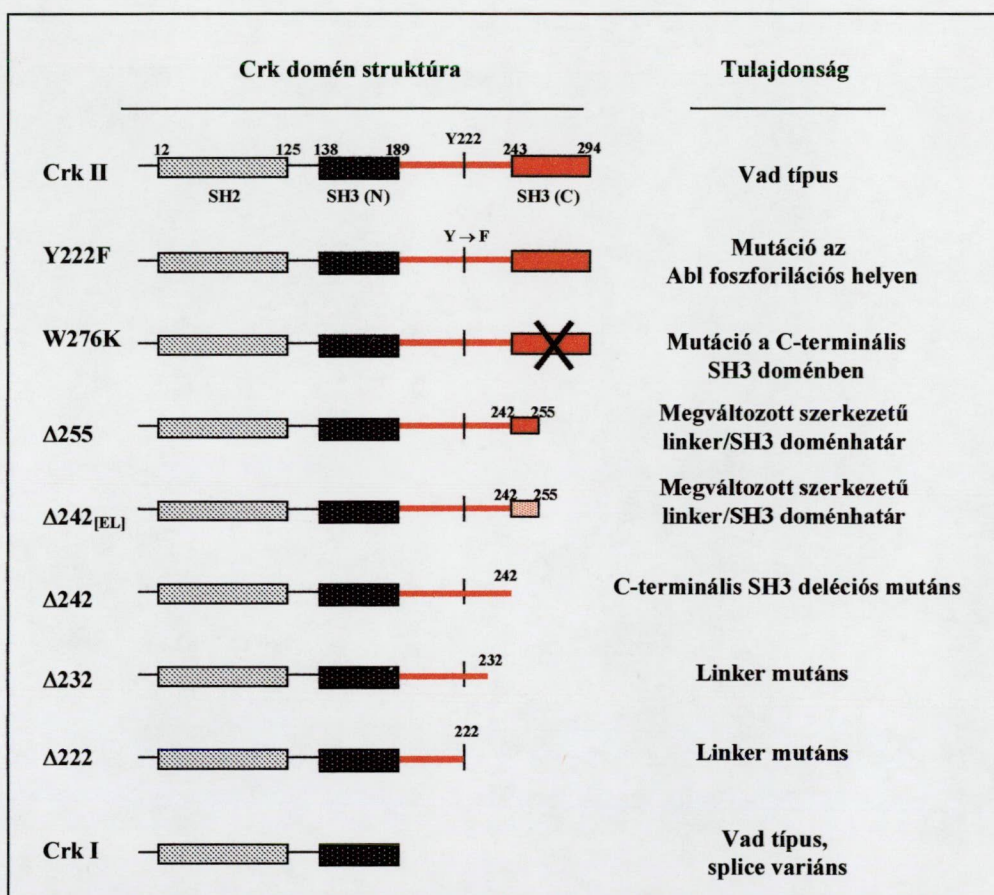
A sejtek fluoreszcens jelöléséhez a fedőlemezeket humán fibronectin (Becton Dickinson) 50 $\mu$ g/ml PBS oldatában 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a felesleges matrix fehérjét PBS pufferrel lemostuk. 48 órával a sejtranszfekciót követően a sejteket összegyűjtöttük és fibronectinnel 5 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> sűrűségben bevont fedőlemezen 12 órát inkubáltuk. Közvetlenül a jelölés előtt a sejteket 3% paraformaldehidben 30 percig fixáltuk, mostuk, majd 0.2% Triton-X oldattal 5 percig permeabilizáltuk. A lemezt ezután 50mM glicint tartalmazó PBS oldattal 10 percig blokkoltuk, majd 0.25% zselatin oldattal 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az elsődleges ellenanyagot (anti-paxillin és anti-pY 4G10, 1:200 hígításban) parafilmre cseppentettük és az előkészített sejteket tartalmazó fedőlemezeket az oldatra ráfordíva 45 percig, majd többszöri mosás után 1:200 hígítású rodamin-konjugált anti-egér ellenanyaggal további 30 percig inkubáltuk. Mosás után a fedőlemezeket ProLong antifade reagens (Molecular Probes) segítségével tárgylemezre rögzítettük és Nikon E800 Eclips fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A fényképek a mikroszkóphoz rögzített digitális

fényképezőgéppel, JPG file formátumban készültek. A sejtfelszíni területet a sejt körvonal mérése után integrálással, az Adobe Photoshop software segítségével állapítottuk meg.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A rekombináns Crk fehérjét kódoló plazmid konstrukciók létrehozása.

A C-terminális SH3 domén és a linkerrégió szerepének tanulmányozására különböző mutáns Crk fehérjét expresszáló rekombináns plazmidokat állítottunk elő. A dolgozatban használt CrkII mutánsok szerkezetét és tulajdonságait a 6. ábra mutatja.



6. ábra. A dolgozatban használt CrkII mutánsok szerkezete és tulajdonsága.

A CrkY222F mutánt a linkerrégió 222-es pozíciójú tirozin-fenilalanin pontmutációja, a CrkW276K mutánt a C-terminális SH3 domén 276-os pozíciójú triptofán-lizin cseréje, a CrkΔ255 és a CrkΔ242<sub>EL</sub> mutánsokat a linkerrégió/C-

terminális SH3 domén határ megváltozott szerkezete, a Crk $\Delta$ 242 mutánst a teljes C-terminális SH3 domén hiánya, a Crk $\Delta$ 232 és a Crk $\Delta$ 222 mutánsokat a linkerrégióknak a jelzett helyen történő deléciója jellemez. Kísérleteinkhez a két, vad típusú természetes splice variáns, a CrkII és a CrkI mellett négy, a C-terminális SH3 domént és három, a linkerrégiót érintő deléciós és pontmutáns fehérjét kódoló plazmidot transzfektáltunk NIH3T3 fibroblaszt és humán vese epithelium sejt sejt vonalba (HEK 293T).

#### **4.2. A C-terminális Crk mutánsok hatása a p130<sup>cas</sup> *in vivo* foszforiláltsági állapotára.**

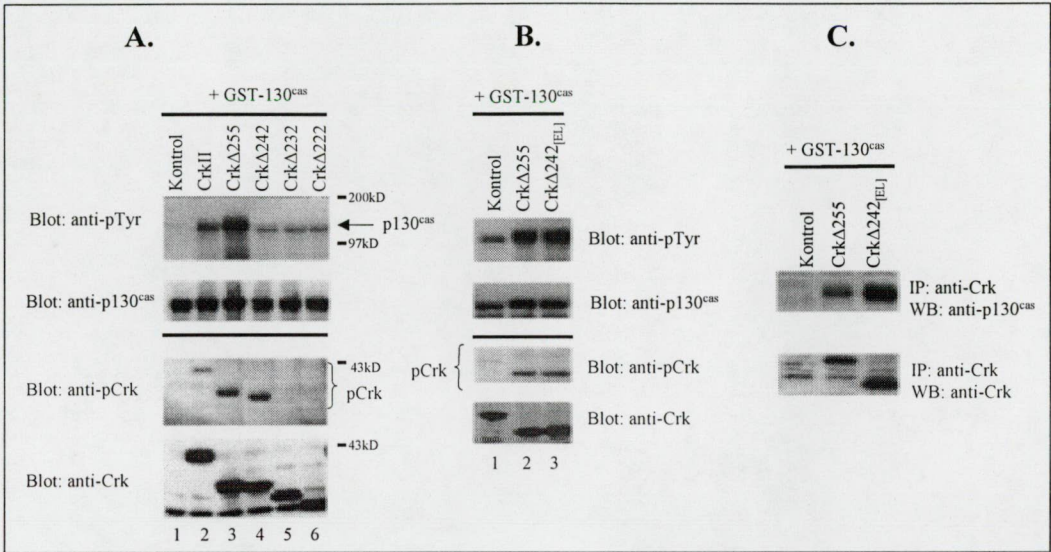
A különböző Crk mutásokat (7.ábra) illetve a p130<sup>cas</sup> fehérjét transzfekcióval együtt juttattuk be humán vese epithel sejt vonalba (HEK 293T) és Western blot analízissel vizsgáltuk a fehérjék foszforiláltsági állapotát. Kísérleteink azt mutatták, hogy a p130<sup>cas</sup> foszforilációja nagymértékben függött a Crk expressziójától (7.ábra A. Panel, 1. és 2. oszlop). A különböző C-terminális deléciós mutánsok, Crk $\Delta$ 222, Crk $\Delta$ 232 és Crk $\Delta$ 242 a vad típusú CrkII fehérjéhez képest mind közel azonos mértékben emelték a foszforilált p130<sup>cas</sup> mennyiségét. (7.ábra A. Panel, 4. 5. és 6. oszlop) Ezzel ellentétben a Crk $\Delta$ 255 mutáns, mely a teljes linker régiót és a C-terminális SH3 domén 13 aminosav hosszúságú szekvenciáját tartalmazta (6.ábra) igen nagy mértékben emelte a p130<sup>cas</sup> foszfortirozin szintjét. (7.ábra A. Panel, 3. oszlop, anti-pTyr blot)

Mindemellett a Crk $\Delta$ 255, és a Crk $\Delta$ 242, a Crk $\Delta$ 232-vel és a Crk $\Delta$ 222-vel ellentétben hiperfoszforilációt mutatott a 222 pozíciójú tirozinon. (7.ábra A. Panel, anti-pCrk blot). Sem a Crk $\Delta$ 222, sem a Crk $\Delta$ 232 nem mutatott foszforilációt a Y222 tirozinon annak ellenére, hogy a foszforilációs hely mindkét mutánsnál ép volt.

Ezek az eredmények magyarázhatók azzal, hogy a C-terminális SH3 domén elején elhelyezkedő 242-255 aminosav hosszúságú szekvencia egy olyan effektor molekulát köt, mely önmagában felelős a p130<sup>cas</sup> emelt foszfortirozin szintjéért, esetleg meghatározza a szubsztrát specificitást, vagy a linker régió/C-terminális SH3 doménhatár szerkezeti eltérésekből adódó konformációváltozása



meggátolja a linkerrégió természetes inhibitor funkcióját. Ennek eldöntésére egy mesterséges Crk $\Delta$ 255 mutánst állítottunk elő, amelyben a 242-255 terjedő aminosav szekvenciát egy indifferens, a pEBB klónozó vektorból származó szekvenciával cseréltük fel, mely egyetlen ismert emlős fehérjével sem mutat homológiát (Crk $\Delta$ 242-Extended Linker, Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub>). Ez a mutáns közel olyan mértékben emelte a p130<sup>cas</sup> foszfortirozin szintjét, mint a Crk $\Delta$ 255 (7.ábra B. panel).



**7.ábra.** A c-CrkII fehérje expressziója 293T sejtekben a p130<sup>cas</sup> fehérje tirozin hiperfoszforilációját okozza. **A.** 293T sejtek transziens kotranszfekciója a jelzett Crk mutáns és a GST-p130<sup>cas</sup> fehérjével. (teljes sejtlyázátum). Bal oldalon az immunoblothoz használt ellenanyagok, jobb oldalon a mólsúlyok vannak feltüntetve. **B.** 293T sejtek transziens kotranszfekciója a jelzett Crk $\Delta$ 255 ill. Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> mutáns és a GST-p130<sup>cas</sup> fehérjével (teljes sejtlyázátum). Jobb oldalon az immunoblothoz használt ellenanyagok vannak feltüntetve. **C.** 293T sejtek a jelzett kotranszfekciója a jelzett fehérjékkel. A gélen az immunoprecipitált fehérjék vannak megfuttatva. Az immunprecipitációhoz és a Western blothoz használt ellenanyagok az ábra jobb oldalán vannak feltüntetve. Kontrollként nem transzfektált sejtextraktumot használtunk.

Anti-Crk ellenanyaggal végzett koimmunprecipitációs vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> szignifikánsan több p130<sup>cas</sup> fehérjét kötött, mint a vad típusú CrkII. (7.ábra C panel.) Mindez azt jelzi, hogy az emelt foszfortirozin szint valójában emelt mennyiségű Crk/p130<sup>cas</sup> fehérje komplex jelenlétére is utal.

### 4.3. Mi okozza a p130<sup>cas</sup> és a Crk mutánsok emelt foszfortirozin tartalmát?

Irodalmi adatokból ismert, hogy a c-CrkII SH3/SH3 linker régióban lévő 222 pozíciójú tirozin aminosavat a nem-receptor típusú Abl tirozin kináz és az Arg foszforilálhatja (Feller *et al.*, 1994), a p130<sup>cas</sup> foszforilációjáért pedig a Src kináz (Sakai *et al.*, 1997), valamint az integrin mediált sejtadhéziót követően a FAK felelős (Polte *et al.*, 1995).

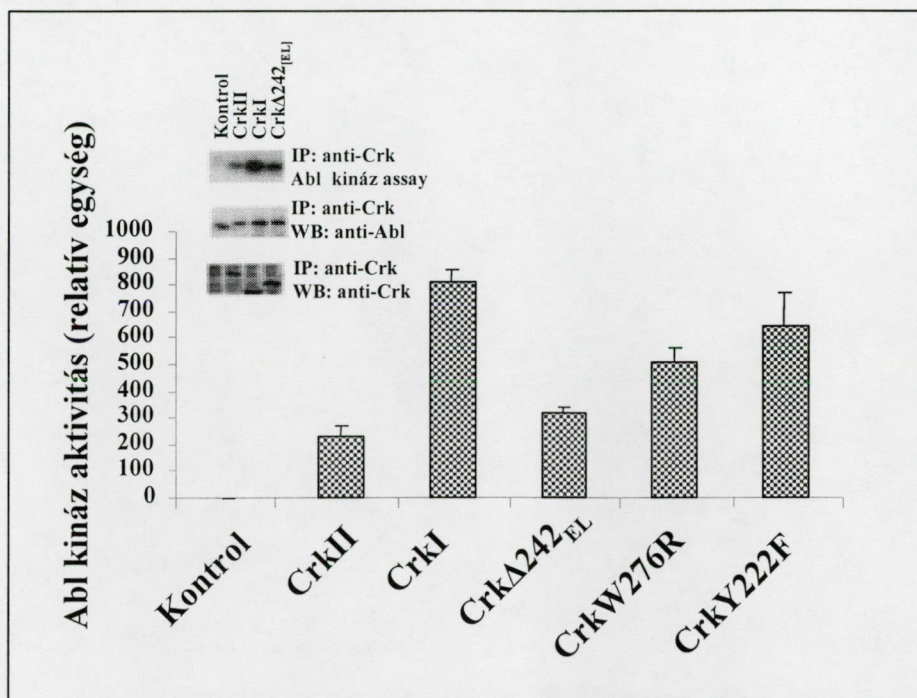
Annak megállapítására, hogy a c-Abl és FAK tirozin kinázoknak van-e hatásuk a p130<sup>cas</sup>, a CrkΔ242<sub>EL</sub> és a CrkΔ255 mutánsok emelt foszfortirozin színjére, a következő kísérleteket végeztük.

#### 4.3.1. Abl kináz szerepe a CrkY<sup>222</sup> foszforilációban.

A c-Abl kinázt illetve a C-terminális CrkW276K, CrkY222F, CrkΔ242<sub>EL</sub> mutáns, valamint a CrkI és a CrkII vad típusú fehérjét 293T sejtekbe kotranszfectáltuk, majd a sejtextraktumot anti-Crk (anti-RF51, mely specifikusan a Crk-SH2 domént ismeri fel) ellenanyaggal immunprecipitáltuk és teszteltük az immunkomplexekhez kapcsolt Abl kináz aktivitást. Szubsztrátként a GST-Crk120-225 fehérjét (Escalante *et al.*, 2000), kontrollként nem transzfectált sejtextraktumot használtuk. A precipitált Crk fehérjék mennyisége az összes transzfectált sejtpopulációban közel azonos volt. Minden, a vizsgálatban szereplő mutánshoz kapcsolt Abl kináz aktivitás magasabb volt, mint a kontrol (nem transzfectált sejtek) illetve a vad típusú CrkII-hez kapcsolt Abl kináz aktivitása. Ezen belül is a CrkI fehérjéhez asszociálódó Abl kináz aktivitás szignifikánsan nagyobb volt a mind a kontrolhoz, mind a többi vizsgált C-terminális mutánshoz képest. (8.ábra) Mindez azt mutatja, hogy a C-terminális régió közvetlen szerepet játszik a Crk-Abl kölcsönhatásban és a Tyr<sup>222</sup> foszforilációban. Ezzel ellentétben a CrkΔ242<sub>EL</sub> mutánshoz asszociálódó Abl kináz aktivitás csak kismértékben volt magasabb a vad típusú CrkII mutáns fehérjéhez képest, ami azonban nem függ össze a CrkΔ242<sub>EL</sub> mutáns magas pY222 színjével. Ez arra enged következtetni,



hogy a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> hatása a p130<sup>cas</sup> foszfo-tirozin szintjére a c-Abl kináztól független mechanizmuson keresztül történik.



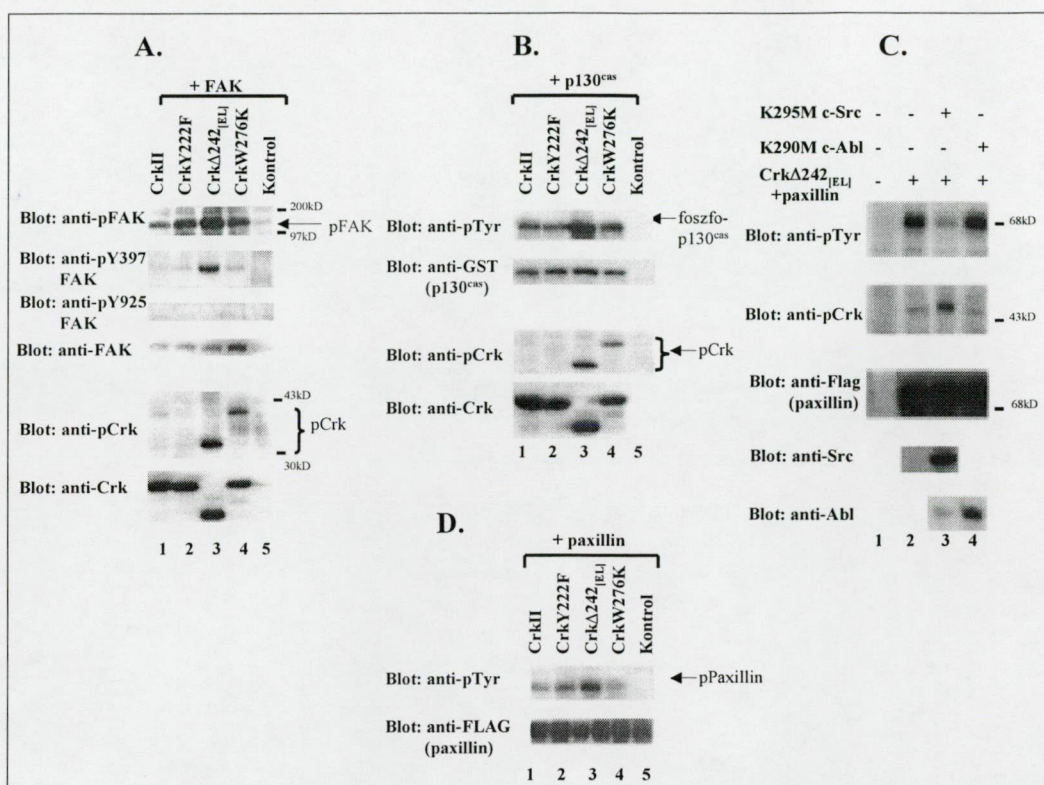
**8.ábra.** c-Abl kináz assay. A C-terminális Crk mutánsok emelik a fehérjéhez kapcsolt c-Abl kináz mennyiségét. A gélen az immunoprecipitált fehérjék vannak megfuttatva. Kontrollként nem transzfektált sejtextraktumot használtunk.

#### 4.3.2. A FAK szerepének tisztázása a foszforilációban.

A FAK szerepének tisztázásához a CrkW276K, CrkY222F, Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> mutánsokat és a vad típusú CrkII-t együtt expresszáltattuk a vad típusú FAK kinázzal. (9.ábra).

Azt találtuk, hogy a FAK foszforilációja egyértelműen a Crk II fehérje expressziójától függött (9.ábra A panel 1. és 5. oszlop). A CrkW276K, mely a C-terminális SH3 doménben mutáns, illetve a CrkY222F, mely a Y<sup>222</sup> foszforilációs helyen mutáns a vad típusú kontrolhoz képest kisebb mértékben emelte a FAK foszfortirozin szintjét, mint a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub>, mely mind a kontrolhoz, mind a vad típusú CrkII fehérjéhez képest szignifikánsan nagyobb mértékben emelte a FAK *in vivo* foszfortirozin szintjét. (9.ábra A panel, anti-pFAK blot).





**9.ábra.** A C-terminális mutáns CrkII hatása a FAK aktivációra és a FA fehérjék, paxillin, p130<sup>cas</sup> foszfortirozin szintjére (a géleken teljes sejtlizátumok vannak megfuttatva). **A.** 293T sejtek tranziens kotranszfekciója a jelzett Crk mutáns és a FAK fehérjével. **B.** 293T sejtek tranziens kotranszfekciója a jelzett Crk mutánsokkal és a p130<sup>cas</sup> fehérjével. **C.** 293T sejtek kotranszfekciója a jelzett kinázokkal és a CrkΔ242<sub>EL</sub>/paxillin fehérjékkel. **D.** 293T sejtek tranziens kotranszfekciója a jelzett Crk mutánsokkal és a paxillin fehérjével. Az ábrák bal oldalán az immunoblothoz használt ellenanyagok, jobb oldalán a molsúlyok vannak feltüntetve vannak feltüntetve. Kontrollként nem transzfektált sejtextraktumot használtunk.

Az integrin aktivációt követően a FAK kináz aktivitása és ezzel párhuzamosan a kulcspozíciójú 397 tirozin foszforiláltsági foka (autofoszforilációs hely) nagymértékben megnő, a foszforilált Y397 kapcsolódási helyet kínál a c-Src kináznak, mely az SH2 csoportján keresztül kapcsolódik a FAK-hoz (Schaller *et al.*, 1994; Eide *et al.*, 1995) és foszforilálja a FAK további 5 tirozincsoportját illetve a FA komplexhez kapcsolódó egyéb fehérjéket, mint pl. p130<sup>cas</sup>-t és paxillint (Hildebrand *et al.*, 1995). A pY925 aminosavhoz az SH2

doménjén keresztül a Grb2 kapcsolódik aktiválva ezzel a Ras/MAP szignál utat (Schlaepfer *et al.*, 1997) (5. ábra).

Foszfotirozin specifikus anti-FAK ellenanyaggal végzett Western blot kísérleteink azt mutatták, hogy a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> által indukált magas FAK foszfotirozin szintet a 397 tirozincsoport megemelkedett foszforiláltsága is okozhatja. Kísérletünkben a másik két C-terminális mutáns, a CrkW276K és a CrkY222F csak alig kimutatható hatással volt a FAK Y397 foszforilációjára. (9. ábra A panel, anti-pY397FAK blot). Ezen felül mind a p130<sup>cas</sup> (9. ábra B panel) mind a paxillin (9. ábra D panel) Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> által indukált magas pTyr szintje jól korrelált a FAK megemelkedett pTyr szintjével. A p130<sup>cas</sup> és a paxillin foszforilációt sem a Crk pY<sup>222</sup> (CrkII és CrkY222F, 9. ábra B és D panel, anti-pTyr blot 1. és 2. oszlop), sem a C-terminális SH3 domén pontmutációja nem befolyásolta. Egyedül ennek a doménnek a részleges deléciónja emelte a paxillin és a p130<sup>cas</sup> foszfotirozin szintjét.

Míg a kináz hiányos K295M c-Src túltermelődése gátolta a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub>-mediált paxillin foszforilációt, és nem volt hatással a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> Y222 foszforilációra, addig a kináz hiányos c-Abl blokkolta a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> Y222 foszforilációt és nem befolyásolta a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> mediált paxillin foszforilációt. (9. ábra C panel)

Összefoglalva az Abl és FAK kinázokkal végzett kísérleteink adatait elmondhatjuk, hogy a C-terminális CrkII régió mind az Abl, mind a FAK jelátviteli utak szabályzásához szükséges szabályzó elemeket tartalmaz.

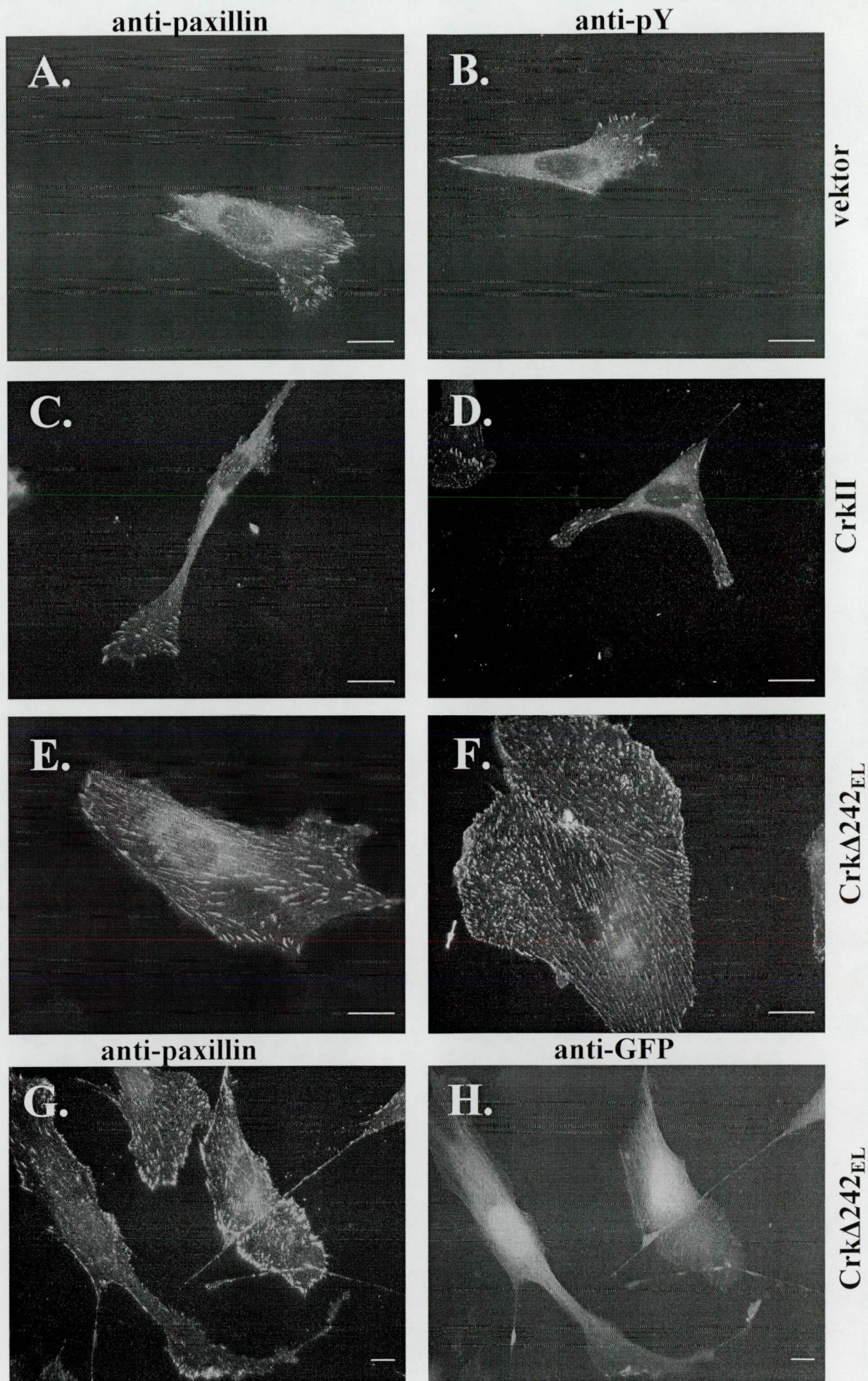
#### **4.4. A Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> expressziója NIH3T3 sejtekben nagymértékben emeli a FA komplexek számát.**

Korábbi irodalmi adatok támasztják alá azt a tényt, hogy a FAK aktiváció és a FA komplexek kialakulása egymással szorosan összefüggő folyamat (Giancotti *et al.*, 1999).

Annak ellenőrzésére, hogy a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> mutánsnak van-e valamilyen hatása a FA komplexekre, NIH3T3 sejteket rekombináns retrovírus vektorral

transzfektáltunk. A bicisztronos retrovírus vektorok a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> mutánst vagy a vad típusú CrkII fehérjét, a GFP marker génnel együtt kódolták. IRES (internal ribosome entry site) segítségével a két fehérje azonos promóterről, de külön mRNS-ként íródott át a sejtekben. A GFP pozitív sejteket FACS technikával kiválasztottuk és anti-GFP illetve anti-Crk ellenanyaggal kimutattuk, hogy a GFP pozitív sejtekben valóban kifejeződik a Crk fehérje is (11. ábra). A retrovírus infekciót követően a sejteket fibronektinnel kezelt fedőlemezekre tettük és vizsgáltuk a FA komplexek mennyiségét (anti-paxillin ellenanyaggal) (10. ábra, A-C-E panelek) illetve azok pTyr tartalmát (anti-pTyr ellenanyaggal) (10. ábra, B-D-F). A Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> transzfektált sejtek közel kétszer nagyobb felületen tapadtak a fedőlemezekre, mint a vad típusú CrkII fehérjét illetve az üres vektort expresszáló sejtek, ami együtt járt a FA komplexek számának növekedésével is (10. ábra, A-C-E panelek, és 11. ábra). Ezekben a sejtekben a FA komplexek erős pTyr festődést mutattak, ami arra utal, hogy a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> növeli az érett FA komplexek stabilitását (10. ábra, F. panel). Ezzel ellentétben a vad típusú CrkII fehérjét túlermelő sejtek orsó formájúak voltak, hosszú filopódiumokat növesztettek és kevesebb volt a FA komplexek száma a vektorhoz képest (10. ábra, C-D panel). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az intakt C-terminális SH3 domén negatívan befolyásolhatja a komplexek *in vivo* stabilitását.

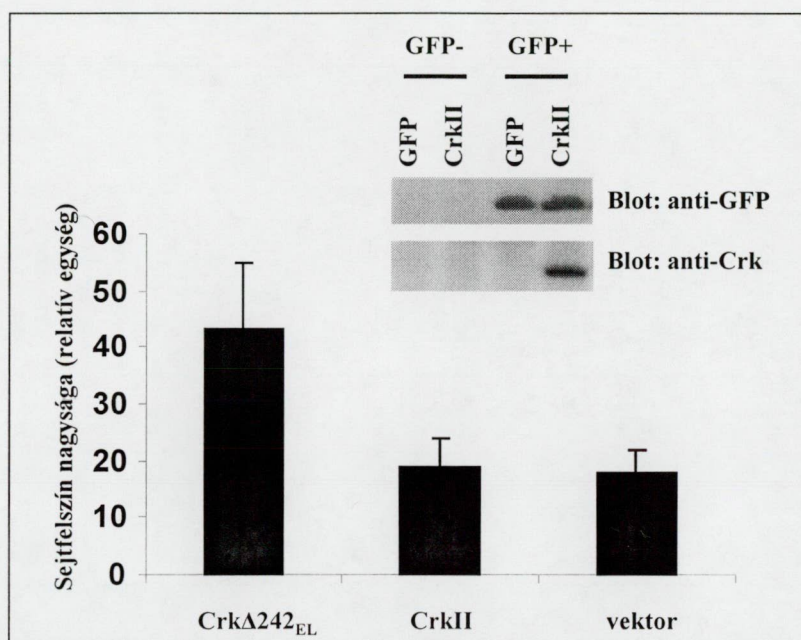




10.ábra. Az ábramagyarázatot lásd a következő oldalon.



**10.ábra.** A Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> mutáns fehérje túlermelődése NIH3T3 sejtekben emeli a FA komplexek számát. A sejteket rekombináns pCX-GFP (A. és B. panelek), pCX-GFP-CrkII (C. és D. panelek) és pCX-GFP-Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> (E. és F. panelek) fehérjét kifejező retrovírussal transzfektáltuk. Az immunfluoreszcenciához anti-pTyr (B. D. és F. panelek) és anti-paxillin (A. C. és E. panelek) elsődleges illetve rodamin-konjugált másodlagos ellenanyagot használtunk. A G. és H. panelek a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> pozitív és a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> negatív sejtek anti-paxillin festődését (G. panel) és ugyanazon sejtek GFP fluoreszcenciáját (H. panel) mutatják azonos látómezőben. A eredeti nagyítás 630-szoros. A képek jobb alsó sarkában lévő méretvonal 3 $\mu$ m.



**11.ábra.** A diagramm a jelzett Crk mutáns fehérjét és a GFP jelző fehérjét együtt kifejező NIH3T3 sejtek relatív sejtfelszíni nagyságát, a Western blot a két fehérje együttes jelenlétét mutatja (teljes sejtlizátum).

#### 4.5. A Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> által indukált FAK, paxillin és p130<sup>cas</sup> hiperfoszforilációt a protein foszfatáz PTP-PEST ellensúlyozza.

A FA komplexben az integrinek, a sejt szerkezeti- és jelátvivő fehérjéi jól definiált rendszer szerint kapcsolódnak. Ezt a dinamikus kapcsolatot és ezen keresztül a FA komplexek létrejöttét, illetve szétesését a sejtekben működő

kinázok és foszfatázok működésének mindenkori egyensúlya biztosítja.

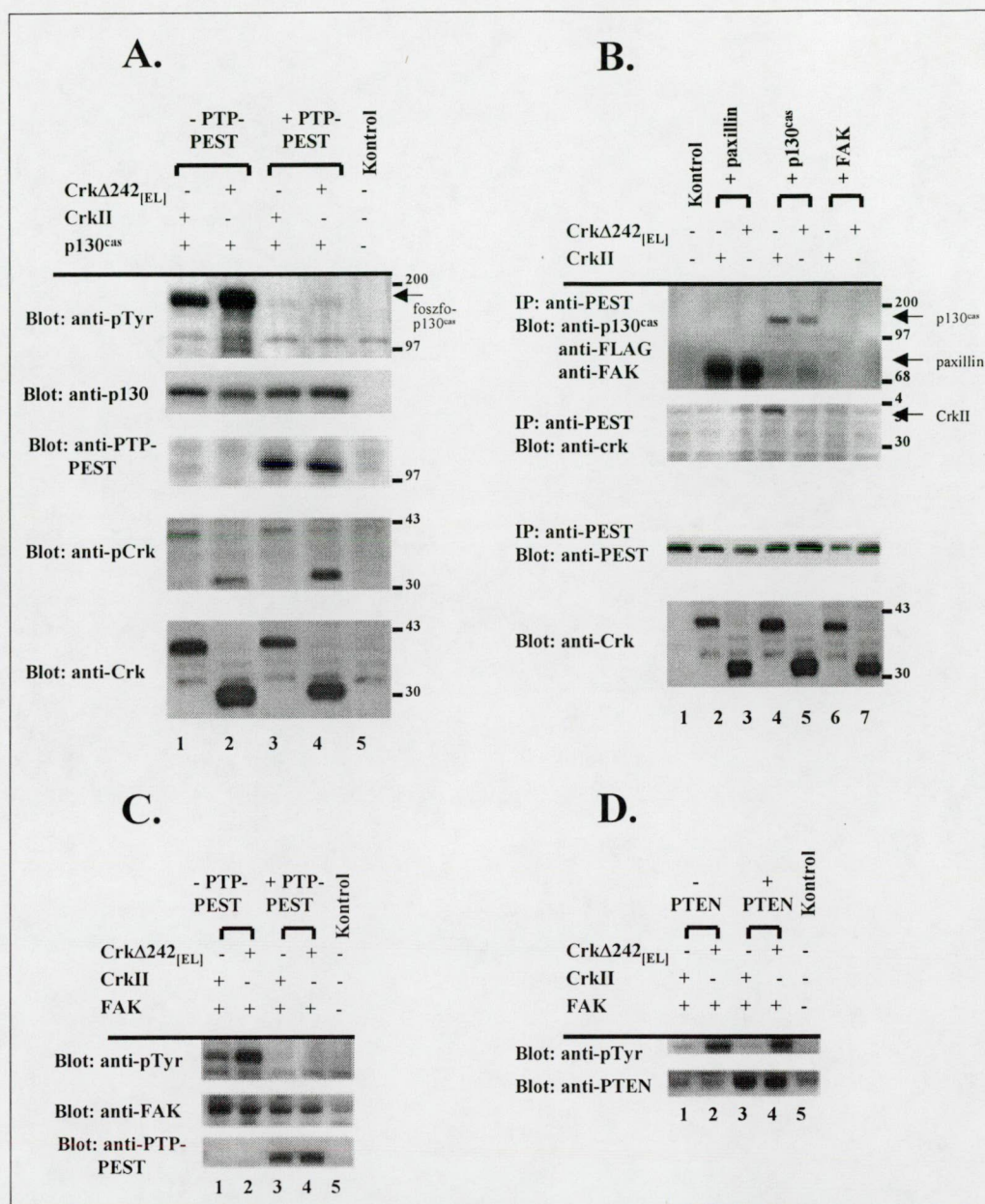
Mi két, a paxillin, FAK és p130<sup>cas</sup> fehérjék defoszforilációban feltételezhetően szerepet játszó foszfatáz (PTP-PEST és PTEN) működését vizsgáltuk. A PTP-PEST deficiens egérből származó fibroblaszt sejtekre a paxillin, a p130<sup>cas</sup> és a FAK hiperfoszforilációja, valamint a normál sejtekhez képest nagyobb számú FA komplex jellemző (Angers-Loustau *et al.*, 1999). Mind a p130<sup>cas</sup>, mind a paxillin fehérjéről kimutatták, hogy specifikus kölcsönhatásban van a PTP-PEST foszfatázzal (Cote *et al.*, 1999; Garton *et al.*, 1999).

Annak eldöntésére, hogy a Crk-mediált paxillin és p130<sup>cas</sup> hiperfoszforilációt a PTP-PEST ellensúlyozza-e, 293T sejteket CrkII, CrkΔ242<sub>EL</sub> és PTP-PEST vektorokkal, illetve a különböző FA fehérjékkel kotranszfektáltuk (12. ábra A panel). A PTP-PEST hatására mind a CrkII mind a CrkΔ242<sub>EL</sub> által indukált p130<sup>cas</sup> hiperfoszforiláció megszűnt (12. ábra A panel, 1., 2. és 3., 4. oszlop, anti pTyr blot). Ezzel ellentétben a PTP-PEST semmilyen hatással nem volt a Crk Tyr<sup>222</sup> foszforiláltságára. (12. ábra A panel, anti pCrk blot).

Mivel a PTP-PEST a FA fehérjéhez kapcsolódva szabályozza a FA komplexek kialakulását illetve szétesését, megvizsgáltuk, hogy a CrkΔ242<sub>EL</sub> indirekt módon hatással van-e erre a kölcsönhatásra. Azt tapasztaltuk, hogy a CrkΔ242<sub>EL</sub> mutáns expressziója nem befolyásolta a p130<sup>cas</sup> és a paxillin asszociációját a PTP-PEST foszfatázzal (12. ábra, B panel).

Annak ellenére, hogy nem találtunk direkt kapcsolatot a PTP-PEST és a FAK között sem, a PTP-PEST túltermelődése teljesen ellensúlyozta a CrkΔ242<sub>EL</sub> által indukált FAK hiperfoszforilációt (12. ábra, C panel). Ezek a hatások a PTP-PEST-re specifikusak, mert a PTEN expresszió nem volt hatással a Crk indukált FAK foszforilációra (12. ábra, D panel).





**12.ábra.** A PTP-PEST és a PTEN foszofatázok szerepe a Crk mediált paxillin és p130<sup>cas</sup> tirozinfoszforilációra. Bal oldalon az immunoblothoz és az immunprecipitációhoz használt ellenanyagok, jobb oldalon a mólsúlyok vannak feltüntetve **A.** 293T sejtek tranziens kotranszfekciója a vad típusú CrkII, a mutáns CrkΔ242<sub>EL</sub> és a p130<sup>cas</sup> fehérjékkel, majd immunprecipitáció anti-PTP-PEST ellenanyaggal (teljes sejtizátum). **B.** A CrkΔ242<sub>EL</sub> mutáns nincs hatással a PTP-PEST és a FA fehérjék kölcsönhatására. A gélen az immunoprecipitált fehérjék vannak megfuttatva. **C.** A PTP-PEST ellensúlyozza; a PTEN **D.** nincs hatással a Crk-indukált FAK hiperfoszforilációra. (teljes sejtizátum). Kontrollként nem transzfectált sejtextraktumot használtunk.

## 5. ÖSSZEGZÉS, TÁRGYALÁS

### 5.1. Az eredmények összefoglalása.

A CrkII egy SH2-SH3-SH3 doménszerkezetű adapter fehérje, mely fontos szerepet játszik sok extracelluláris ingert követő jelátviteli folyamatban. A fehérje SH2 és N-terminális SH3 csoportjáról sok adat gyűlt már össze, beleértve a kölcsönható fehérjék azonosítását illetve az ezekhez kötött funkciót.

Kérdéses azonban a C-terminális SH3 csoport és a SH3 doméneket összekötő linker régió szerepe, mivel nem sikerült még ezekkel a régiókkal kölcsönható fehérjéket azonosítani. Kísérleteink célja az volt, hogy a C-terminális és a linkerrégió szerepét minél jobban megértsük. Eredményeink az alábbiakban összegezhetők (13. ábra):

1. Különböző, a C-terminális SH3 domént és a linker régiót érintő mutánst állítottunk elő és vizsgáltuk a tirozin kináz jelátviteli folyamatban betöltött szerepét.
2. A C-terminális mutánsok (CrkW276K, CrkY222F és a Crk $\Delta$ 242) és a CrkI mind emelték az N-terminális doménhez kötött c-Abl kináz mennyiségét és ezzel párhuzamosan a CrkY222F kivételével a Crk Tyr<sup>222</sup> foszforilációt.
3. A deléciós mutánsokkal végzett kísérletek a fehérjének egy, a FAK aktivációjában szerepet játszó szegmentjének szerepére is rávilágítottak. Ezek a mutánsok, a Crk $\Delta$ 255 (C-terminális SH3 domén delécia) és a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> (Crk $\Delta$ 242 extended linker), melyeket a linker régió/C-terminális SH3 doménhatár megváltozott szerkezete jellemez, a FA komplexben jelenlévő fehérjék, a FAK, a paxillin és a p130<sup>Cas</sup> erős hiperfoszforilációját okozták.



4. A CrkΔ242<sub>EL</sub> mutáns ezen felül nagymértékben emelte az NIH3T3 fibroblaszt sejtek FA komplexeinek számát.
5. A CrkΔ242<sub>EL</sub> hiperfoszforilációt indukáló hatását mind a PTP-PEST, mind a domináns negatív c-Src túltermelődése ellensúlyozta. Nem volt ilyen hatással azonban sem a PTEN foszfatáz, sem a domináns negatív c-Abl túltermelődése.

Név	Tulajdonság	Hatása a FAK kinázra	Hatása az Abl kinázra	Hatása a paxillin és p130 <sup>cas</sup> foszforiláltsági állapotára	Hatása NIH3T3 sejtek FA komplexeinek számára
CrkII	Vad típus	+	+	+	+
Y222F	Mutáció az Abl foszforilációs helyen	++	+++	+	NA
W276K	Mutáció a C-terminális SH3 doménben	++	+++	++	NA
Δ255	Megváltozott szerkezetű linker/SH3 doménhatár	++++	++	++++	NA
Δ242 <sub>EL</sub>	Megváltozott szerkezetű linker/SH3 doménhatár	++++	++	++++	++++
Δ242	C-terminális SH3 deléciós mutáns	+	NA	+	NA
Δ232	Linker mutáns	+	NA	+	NA
Δ222	Linker mutáns	+	NA	+	NA
CrkI	Vad típus, splice variáns	+	+++	NA	NA

Crk II — 12 — SH2 — 189 — SH3 (N) — Y222 — 243 — SH3 (C) — 294

— A FAK negatív szabályozásában résztvevő régió

— Az Abl negatív szabályozásában résztvevő régió

13.ábra. Az eredmények összefoglalása. (NA: nincs adat)

Kísérleteink azt bizonyítják, hogy a C-terminális régió olyan negatív szabályzó elemeket tartalmaz, melyek konformáció változása, vagy asszociációja más fehérjékkel (pl. PTP) a fehérje funkcióját, s ezáltal mind az Abl, mind a FAK mediált jelátviteli folyamatokat negatívan befolyásolhatják.

## 5.2. Tárgyalás.

Kísérleteinkkel kimutattuk egyrészt, hogy a CrkW276K mutáns (pontmutáció a C-terminális SH3 doménben), a CrkY222F mutáns (pontmutáció a tirozin foszforilációs helyen) és a C-terminális deléciós mutánsok, CrkI (természetes splice variáns) és a Crk $\Delta$ 242 (C-terminális SH3 domén deléción) mind nagyobb mennyiségű c-Abl kinázt kötöttek és ezzel párhuzamosan emelt CrkY<sup>222</sup> foszforilációt mutattak (kivéve a CrkY222F mutánst, ahol a foszforilációs hely mutáns volt). Másrészt a C-terminális mutáns Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> és a linker régió mutáns Crk $\Delta$ 255, melyeket a SH3 linker régió/C terminális SH3 doménhatár megváltozott szerkezete jellemez, a FAK és a FA fehérjék, paxillin, p130<sup>cas</sup> foszforilációját okozza és ezzel párhuzamosan a fibroblaszt sejtek FA komplexeinek számát nagymértékben megnöveli.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Crk C-terminális régiója szabályzó szerepet játszhat mind az Abl mind a FAK mediált tirozin kináz szignál utakban, ami megfelel az irodalomból már ismert adatnak, miszerint a Crk C-terminális régió feltételezhetően negatív reguláló szerepet tölthet be (Ogawa *et al.*, 1994).

A C-terminális mutánsok, Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub>, CrkW276K, CrkY222F és a splice variáns CrkI-t mind nagyobb mennyiségű Abl kinázt kötöttek a kontrollhoz képest. Ezzel jól korrelált a mutáns fehérjék magas pTyr<sup>222</sup> szintje, mely arra enged következtetni, hogy a C-terminális SH3 domén/linker régió visszahajolva szterikusan gátolja az N-terminális SH3 domén/Abl kináz kölcsönhatást, megakadályozva ezzel az Abl mediált Tyr<sup>222</sup> foszforilációt. Irodalmi adatok támasztják alá, hogy a Crk Tyr<sup>222</sup> foszforilációja konformáció változást okoz a fehérje N-terminális részén gátolva mind az SH2, mind az N-terminális SH3 mediált kölcsönhatásokat (Escalante *et al.*, 2000; Rosen *et al.*, 1995).

Kérdéses, hogy a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> milyen módon emeli a FAK pTyr<sup>397</sup> szintjét, hiszen a mai napig nem sikerült a C-terminális SH3 doménnel vagy a linker régióval kölcsönható effektor fehérjét azonosítani. Kizaka-Kondoh és munkatársai (1996) olyan specifikus, szintén a C-terminális SH3 domén kezdetén levő pontmutációkat állítottak elő (CrkD245R és CrkK254E), melyek megszakították a CrkII mediált EGF jelátvitelt NRK sejtekben (Kizaka-Kondoh *et al.*, 1996). A linker régió igen nagy szekvencia homológiát mutat a különböző fajok, xenopus, csirke, egér, ember között (Reichman *et al.*, 1992). Az 53 aminosav közül 9 prolin, melyek közül néhány homológiát mutat SH3 domén kötő fehérjék kapcsoló szekvenciájával és felveti a lehetőségét a linker régió belüli önálló SH3 kötő régió létezésének. Bár a linker régió belüli nem fordul elő bizonyítottan Crk-SH3 kötő szekvencia (Pro-X-X-Pro-X-Lys), arra is van irodalmi adat, hogy az Abl és Src családba tartozó tirozin kinázok SH3 doménje és egy egyedülálló prolin aminosav közötti kölcsönhatás autoinhibitor modulként funkcionál (Barila *et al.*, 1998). Szerkezeti és biokémiai vizsgálatok mutathatják meg azt, vannak-e olyan specifikus motívumok a linker régióban, melyek direk módon kapcsolódnak az N- vagy a C-terminális SH3 doménhez, illetve hogy a specifikus prolin szubsztitúciók a linker régióban befolyásolják-e a FAK aktivációt, vagy az Abl-Crk kölcsönhatást. Ezek a vizsgálatok deríthetnek fényt arra, hogy van-e molekulán belüli kölcsönhatás a linker régió és a C-terminális SH3 csoport között és ha igen, akkor ez a modul független autoinhibitor egységként működik-e.

A Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> mutánssal végzett kísérletek azonban azt mutatják, hogy a C-terminális rész szerepe a FAK jelátviteli út pozitív szabályozásában független az Abl kináz CrkY<sup>222</sup> foszforilálásában betöltött szerepétől. Ezt a következő tények támasztják alá: 1. a kináz hiányos AblK295M nincs hatással a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> mediált FAK és p130<sup>cas</sup> hiperfoszforilációra. 2. a PTP-PEST túltermelődése blokkolta a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> indukált FAK foszforilációt, viszont nem volt hatással a Crk Tyr<sup>222</sup> foszforilációra. 3. a különböző C-terminális mutációkhoz asszociálódó Abl kináz mennyisége nem korrelált az FAK és a FA fehérjék magas foszforiláltsági szintjével.

Eredményeink alapján az feltételezhető, hogy a Crk adapter fehérje két külön szabályzó mechanizmuson keresztül mindkét irányba befolyásolja a FA

jelátvitelt. Egyrésztől FA jelet közvetít az SH2/SH3 domén kapcsolódáson keresztül azáltal, hogy SH2 doménjével a foszforilált FA fehérjéhez kapcsolódik, N-terminális SH3 doménjén keresztül pedig a C3G, DOCK180 és Abl effektor molekulákat köti (4.ábra) (Kiyokawa *et al.*, 1997). Másrésztől a linker régió/C-terminális SH3 domén negatív reguláló szerepe miatt egy visszacsatoló mechanizmussal szabályozza a FAK, paxillin és p130<sup>cas</sup> tirozin foszforiláltsági állapotát. A jelenlegi modellek szerint az integrin mediált adhézió és sejtmozgás dinamikus folyamat, melyhez a FA komplexek folyamatos „össze- és szétszerelődésére” és ezzel párhuzamosan folyamatos tirozin foszforilációra és defoszforilációra van szükség (Giancotti *et al.*, 1999). A Crk és a hozzá hasonló molekulák, melyek a jelátvitel mindkét irányában képesek a jeltovábbítást szabályozni, pontosan illeszkednek ebbe a dinamikus folyamatba. Az, hogy a CrkΔ242<sub>EL</sub> a FA fehérjék, paxillin és p130<sup>cas</sup> hiperfoszforilációját okozza, valamint fokozza a FA komplexek stabilizációját összegyeztethető azzal a fenotípussal, melyet a PTP-PEST „knock out” fibroblaszt sejteken tapasztaltak. Ezekben a sejtekben a paxillin, p130<sup>cas</sup> és a FAK szintén hiperfoszforilált állapotban van, és a FA komplexek száma jóval nagyobb a normál sejtekhez képest (Angers-Loustau *et al.*, 1999). Mindez azt sugallja, hogy a Crk C-terminális régiója FA komplexek folyamatos „össze- és szétszerelődését” indukálja feltételezve egy Crk→PTP-PEST→FAK kaszkádfolyamatot. A Crk és PEST közötti molekuláris kommunikáció mikéntje nem tisztázott. Irodalmi adatokból ismert, hogy a PTP-PEST kapcsolódáshoz a paxillin molekula LIM3 doménje, illetve a p130<sup>cas</sup> fehérje SH3 doménje szükséges (Garton *et al.*, 1996), mely domének ezeket a fehérjéket a FA komplexekhez kapcsolják. A PTP-PEST szubsztrát specificitását mind *in vivo*, mind *in vitro* kísérletekben analizálták és az eredmények azt mutatták, hogy a fehérje a pYDXP szekvencia részletet tartalmazó molekulákat (pl. p130<sup>cas</sup>, illetve paxillin) részesíti előnyben, csakúgy, mint a Crk-SH2 domén (Cote *et al.*, 1999). A Crk pY<sup>222</sup>AQP motívum viszont nem bizonyult a PTP-PEST számára preferált szubsztrátnak. Kérdéses az, hogy melyik sejten belüli foszfatáz játszik szerepet a pTyr<sup>222</sup> defoszforilációjában.

További kísérleteink arra irányulnak, hogy kéthibrid technika segítségével új, a C-terminális SH3 doménnel kölcsönható fehérjéket azonosítsunk. A Crk

fehérjének a jelátvitelben betöltött pontos szerepére a továbbiakban molekulaszervezeti vizsgálatok illetve a C-terminális régióhoz kapcsolódó fehérjék azonosítása és funkciójuk tisztázása deríthet fényt.



## 6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani minazoknak, akik a munkámban segítettek. Dr. Raymond B. Birge-nek, akinek a laboratóriumában dolgoztam és Dr. Eduardo Fajardo-nak, aki a dolgozat alapjául szolgáló munkámban mindvégig irányított és segített. Dr. Raskó Istvánnak, aki lehetővé tette, hogy csoportjában egyetemistaként dolgozhassam. Dr. Sántha Miklósnak, akitől a molekuláris biológia alapvető technikáit megtanultam. Dr. Puskás Lászlónak, aki jelenlegi munkáim legnagyobb részét átvállalta és ezzel időt biztosított a dolgozat megírásához.

Szüleimnek, Férjemnek és Gyermkeimnek, akik biztatásukkal és türelmükkel mindenben segítettek és támogattak.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

- Anafi M., Rosen M.K., Gish G.D., Kay L.E., and Pawson T. (1996) A potential SH3 domain-binding site in the Crk SH2 domain. *J. Biol. Chem.*, 271:21365–21374.
- Angers-Loustau A, Cote JF, Charest A, Dowbenko D, Spencer S, Lasky LA, Tremblay ML. (1999) Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J Cell Biol.* Mar 8;144(5):1019-31.
- Barila D, Superti-Furga G. (1998) An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nat Genet.* Mar;18(3):280-2.
- Birge R.B., and Hanafusa H. (1993) Closing in on SH2 specificity. *Science*, 262:1522–1524.
- Birge R.B., Fajardo J.E., Reichman C., Shoelson S.E., Songyang Z., Cantley L.C., and Hanafusa H. (1993) Identification and characterization of a high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 13:4648–4656
- Brown MC, Perrotta JA, Turner CE. (1998) Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell.* Jul;9(7):1803-16.
- Burridge K, Turner CE, Romer LH. (1992) Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol.* Nov;119(4):893-903.
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.*;12:463-518. Review.
- Chen HC, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL. (1995) Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem.* Jul 14;270(28):16995-9.
- Cohen G.B., Ren R., and Baltimore D. (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*, 80:237–248.
- Cote JF, Turner CE, Tremblay ML. (1999) Intact LIM 3 and LIM 4 domains of paxillin are required for the association to a novel polyproline region (Pro 2) of protein-tyrosine phosphatase-PEST. *J Biol Chem.* Jul 16;274(29):20550-60.
- Dawid I.B., Breen J.J., and Toyama R. (1998) LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet.*, 14:156–162.

- Dolfi F, Garcia-Guzman M, Ojaniemi M, Nakamura H, Matsuda M, Vuori K. (1998) The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 22;95(26):15394-9.
- Eide BL, Turck CW, Escobedo JA. (1995) Identification of Tyr-397 as the primary site of tyrosine phosphorylation and pp60src association in the focal adhesion kinase, pp125FAK. *Mol Cell Biol*. May;15(5):2819-27.
- Escalante M, Courtney J, Chin WG, Teng KK, Kim JJ, Fajardo JE, Mayer BJ, Hempstead BL, Birge RB. (2000) Phosphorylation of c-Crk II on the negative regulatory Tyr222 mediates nerve growth factor-induced cell spreading and morphogenesis. *J Biol Chem*. Aug 11;275(32):24787-97.
- Feller S.M., Knudsen B., and Hanafusa H. (1995) Cellular proteins binding to the first Src homology 3 (SH3) domain of the proto-oncogene product c-Crk indicate Crk-specific signaling pathways. *Oncogene*, 10:1465–1473.
- Feller S.M., Ren R., Hanafusa H., and Baltimore D. (1994) SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends Biochem. Sci.*, 19:453–458.
- Feller SM, Posern G, Voss J, Kardinal C, Sakka D, Zheng J, Knudsen BS. (1998) Physiological signals and oncogenesis mediated through Crk family adapter proteins. *J Cell Physiol*. Dec;177(4):535-52.
- Felsenfeld DP, Choquet D, Sheetz MP. (1996) Ligand binding regulates the directed movement of beta1 integrins on fibroblasts. *Nature*. 1996 Oct 3;383(6599):438-40.
- Garton AJ, Flint AJ, Tonks NK. (1996) Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Mol Cell Biol*. Nov;16(11):6408-18.
- Garton AJ, Tonks NK. (1999) Regulation of fibroblast motility by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *J Biol Chem*. Feb 5;274(6):3811-8.
- Gesbert F., Guenzi C., and Bertoglio J. (1998) A New Tyrosine-phosphorylated 97-kDa Adaptor Protein Mediates Interleukin-2- induced Association of SHP-2 with p85-Phosphatidylinositol 3-Ki-nase in Human T Lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 273:18273–18281
- Giancotti FG, Ruoslahti E. (1999) Integrin signaling. *Science*. Aug 13;285(5430):1028-32. Review.
- Hasegawa H., Kiyokawa E., Tanaka S., Nagashima K., Gotoh N., Shibuya M., Kurata T., and Matsuda M. (1996) DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol. Cell. Biol.*, 16:1770–1776.
- Hildebrand J.D., Schaller M.D., and Parsons J.T. (1995) Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol. Biol. Cell.*,

6:637–647.

- Keely P., Parise L., and Juliano R. (1998) Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion. *Trends Cell Biol.*, 8:101–106
- Kiyokawa E., Mochizuki N., Kurata T., and Matsuda M. (1997) Role of Crk oncogene product in physiologic signaling. *Crit. Rev. Oncog.*, 8:329–342.
- Kiyokawa E., Hashimoto Y., Kobayashi S., Sugimura H., Kurata T., Matsuda M. (1998) Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* Nov 1;12(21):3331-6.
- Kizaka-Kondoh S., Matsuda M., Okayama H. (1996) CrkII signals from epidermal growth factor receptor to Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 29;93(22):12177-82
- Klemke RL, Leng J, Molander R, Brooks PC, Vuori K, Cheresch DA. (1998) CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol.* Feb 23;140(4):961-72.
- Knudsen B.S., Zheng J., Feller S.M., Mayer J.P., Burrell S.K., Cowburn D., and Hanafusa H. (1995) Affinity and specificity requirements for the first Src homology 3 domain of the Crk proteins. *EMBO. J.*, 14:2191–2198.
- Matsuda M., Mayer B.J., Fukui Y., and Hanafusa H. (1990) Binding of transforming protein, P47gag-Crk, to a broad range of phospho-tyrosine containing proteins. *Science*, 248:1537–1539.
- Matsuda M., Tanaka S., Nagata S., Kojima A., Kurata T., and Shibuya M. (1992) Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities. *Mol. Cell. Biol.*, 12:3482–3489.
- Mayer B.J., and Hanafusa H. (1990) Mutagenic analysis of the v-Crk oncogene: requirement for SH2 and SH3 domains and correlation between increased cellular phosphotyrosine and transformation. *J. Virol.*, 64:3581–3589
- Mayer B.J., Hamaguchi M., and Hanafusa H. (1988) A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature*, 332:272–275.
- Mayer B.J., Hirai H., and Sakai R. (1995) Evidence that SH2 domains promote processive phosphorylation by protein-tyrosine kinases. *Curr. Biol.*, 5:296–305
- Nichols G.L., Raines M.A., Vera J.C., Lacomis L., Tempst P., and Golde D.W. (1994) Identification of CRKL as the constitutively phosphorylated 39-kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood*, 84:2912–2918.
- Nojima Y., Mimura T., Morino N., Hamasaki K., Furuya H., Sakai R., Nakamoto T., Yazaki Y., and Hirai H. (1996) Tyrosine phosphorylation of p130Cas in cell adhesion and transformation. *Hum. Cell*, 9:169–

- Oda T., Heaney C., Hagopian J.R., Okuda K., Griffin J.D., and Druker B.J. (1994) Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J. Biol. Chem.*, 269:22925–22928.
- Ogawa S, Toyoshima H, Kozutsumi H, Hagiwara K, Sakai R, Tanaka T, Hirano N, Mano H, Yazaki Y, Hirai H. The C-terminal SH3 domain of the mouse c-Crk protein negatively regulates tyrosine-phosphorylation of Crk associated p130 in rat 3Y1 cells. *Oncogene*. Jun;9(6):1669-78
- Okada S., Matsuda M., Anafi M., Pawson T., and Pessin J.E. (1998) Insulin regulates the dynamic balance between Ras and Rap1 signaling by coordinating the assembly states of the Grb2-SOS and CrkII-C3G complexes. *Embo. J.*, 17:2554–2565.
- Pawson T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature*, 373:573–580.
- Polte T.R., and Hanks S.K. (1995) Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:10678–10682
- Reichman C.T., Mayer B.J., Keshav S., and Hanafusa H. (1992) The product of the cellular crk gene consists primarily of SH2 and SH3 regions. *Cell Growth Differ.*, 3:451–460.,
- Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. (1993) Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science*. Feb 19;259(5098):1157-61.
- Ren R., Ye Z.S., and Baltimore D. (1994) Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes Dev.*, 8:783–795.
- Rosen M.K., Yamazaki T., Gish G.D., Kay C.M., Pawson T., and Kay L.E. (1995) Direct demonstration of an intramolecular SH2-phosphotyrosine interaction in the Crk protein. *Nature*, 374:477–479
- Sadowski I, Stone JC, Pawson T. (1986) A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol Cell Biol*. Dec;6(12):4396-408
- Sakai R., Iwamatsu A., Hirano N., Ogawa S., Tanaka T., Mano H., Yazaki Y., and Hirai H. (1994) A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *Embo. J.*, 13:3748–3756.
- Sakai R., Nakamoto T., Ozawa K., Aizawa S., and Hirai H. (1997) Characterization of the kinase activity essential for tyrosine phosphorylation of p130Cas in fibroblasts. *Oncogene*, 14:1419–1426.



- Schaller MD, Parsons JT. (1995) pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol Cell Biol.* May;15(5):2635-45
- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. (1994) Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol.* Mar;14(3):1680-8.
- Schlaepfer D.D., and Hunter T. (1998) Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs. *Trends Cell. Biol.*, 8:151–157
- Schlaepfer D.D., Broome M.A., and Hunter T. (1997) Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 17:1702–1713.
- Shen Y, Schneider G, Cloutier JF, Veillette A, Schaller MD. (1998) Direct association of protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST with paxillin. *J Biol Chem.* Mar 13;273(11):6474-81.
- Sicheri F, Moarefi I, Kuriyan J. (1997) Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature.* Feb 13;385(6617):602-9.
- Songyang Z., Shoelson S.E., Chaudhuri M., Gish G., Pawson T., Haser W.G., King F., Roberts T., Ratnofsky S., Lechleider R.J., et al. (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, 72:767–778.
- Stupack DG, Cho SY, Klemke RL. (2000) Molecular signaling mechanisms of cell migration and invasion. *Immunol Res.*;21(2-3):83-8. Review
- Tanaka S., Morishita T., Hashimoto Y., Hattori S., Nakamura S., Shibuya M., Matuoka K., Takenawa T., Kurata T., Nagashima K., et al. (1994) C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3443–3447.
- Tanaka S, Hanafusa H. (1998) Guanine-nucleotide exchange protein C3G activates JNK1 by a ras-independent mechanism. JNK1 activation inhibited by kinase negative forms of MLK3 and DLK mixed lineage kinases. *J Biol Chem.* Jan 16;273(3):1281-4.
- ten Hoeve J., Arlinghaus R.B., Guo J.Q., Heisterkamp N., and Groffen J. (1994) Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia leukemia. *Blood*, 84:1731–1736.
- Tsuchie H., Chang C.H., Yoshida M., and Vogt P.K. (1989) A newly isolated avian sarcoma virus, ASV-1, carries the Crk oncogene. *Oncogene*, 4:1281–1284.
- Turner C.E., and Miller J.T. (1994) Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain

binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *J. Cell. Sci.*, 107:1583–1591

Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG. (1996) The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell*, 87(4):733–43.

Zachary I, Sinnett-Smith J., and Rozengurt E. (1992) Bombesin, vasopressin, and endothelin stimulation of tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Identification of a novel tyrosine kinase as a major substrate. *J. Biol. Chem.*, 267:19031–19034.

## 9. SUMMARY.

The Crk family of adaptor proteins (c-CrkII, c-CrkI, CrkL) are Src Homology 2 (SH2) and SH3 domain containing proteins that have been implicated in many signaling events of proliferation, differentiation, cell adhesion, and cytoskeletal reorganization. Alternative splicing of the c-Crk gene yields two different translation products, c-CrkI (28 kD) and c-CrkII (42 kD) which only differ in their C-terminal region. In c-CrkII, the two SH3 domains are separated by a 54 amino acid proline-rich linker region. This spacer region also contains a tyrosine motif Y222 AQP that can be phosphorylated by c-Abl, creating an intramolecular binding site for the Crk SH2 domain that regulates the folding and ability of both SH2 and SH3 domain interactions with cellular proteins. The role of Crk in the aforementioned signaling pathways is primarily mediated by the SH2 and the first SH3 domain which form specific interactions with intracellular proteins. The SH2 domain of Crk and CrkL binds in the context of phospho Tyr-X-X-Pro, and primarily interact with tyrosine phosphorylated FA proteins p130<sup>cas</sup> and paxillin. The N-terminal SH3 domain of Crk and CrkL binds to proline-rich sequences in the context of Pro-X-X-Pro-X-Lys, and interacts with a limited number of cellular proteins including C3G, a guanine nucleotide exchange factor for Rap1, DOCK180, a regulator of Rac1, and the tyrosine kinase c-Abl.

The involvement of Crk in intracellular signaling is initiated by many types of extracellular stimulation that include growth factors, mitogenic lipids, engagement of the T cell and B cell receptors, and adhesion of cells to extracellular matrix. Many of these induce the tyrosine phosphorylation of the FA proteins p130<sup>cas</sup> and paxillin, which recruit Crk and its SH3 binding partners to the cytoskeleton where the signals can be coupled. Previous studies have shown that binding of DOCK180 to tyrosine phosphorylated p130 cas /c-Crk II complex results in GDP-GTP exchange activity on Rac1, which is critical for integrin-mediated cellular migration. Additionally, binding of C3G to the p130 cas /c-Crk II complex has been implicated in integrin-mediated JNK activation and G1 to S cell cycle progression. Besides acting to transmit signals from tyrosine

phosphorylated focal adhesion proteins to downstream effector pathways, there is also evidence that Crk can feedback and act upstream to activate FAK. For example, in cells transformed by v-Crk, the product of the avian sarcoma virus CT10, oncogenic Crk induces FAK activation and a specific elevation in the tyrosine phosphorylation of p130<sup>cas</sup> and paxillin, indicating that the recruitment of Crk to focal adhesions represents a point of convergence for both upstream and downstream signals to FAK.

Despite the fact that several proteins have been identified that bind to the N-terminal SH3 domain, no cellular molecules have been shown to interact with the Crk C-terminal SH3 domain, and the function of the C-terminus of c-Crk II is poorly understood. Mutations in the C-terminal SH3 domain have been shown to disrupt EGF-induced Ras activation in NRK cells, and the C-terminal SH3 domain negatively regulates the tyrosine phosphorylation of p130<sup>cas</sup> and the transforming ability of Crk. In this study, we have further investigated the role of the C-terminal region in Crk II generating a series of C-terminal SH3 domain and SH3 linker mutants and examined their role in tyrosine kinase pathways.

Expression of point mutations in the C-terminal SH3 domain (CrkW276K), at the tyrosine phosphorylation site (CrkY222F), or truncation of the entire C-terminus (CrkI or Crk $\Delta$ 242), all increased c-Abl binding to the N-terminal SH3 domain of Crk and, where relevant, increased Tyr<sup>222</sup> phosphorylation. Deletion analysis of c-CrkII also revealed the presence of a C-terminal segment important for transactivation of FAK. Such mutants, Crk $\Delta$ 255 or Crk $\Delta$ 242 Extended Linker (Crk $\Delta$ 242<sub>[EL]</sub>), characterized by a disruption in the SH3 linker/C-terminal SH3 boundary, induced robust hyperphosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) on Tyr<sup>397</sup>, hyperphosphorylation of focal adhesion proteins p130<sup>cas</sup> and paxillin and increased focal adhesion formation in NIH3T3 cells. The effects of Crk $\Delta$ 242<sub>[EL]</sub> could be abrogated by co-expression of dominant negative c-Src or the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST, but not by dominant negative Abl.

Our results suggest that the C-terminal region of Crk contains negative regulatory elements important for both Abl and FAK dependent signal pathways, and offers a paradigm for an autoinhibitory region in the SH3 linker/C-terminal



SH3 domain. On the one hand, mutants in the C-terminal SH3 domain (CrkW276K) or deletions in the entire C-terminal SH3 domain, including the splice variant c-CrkI, enhance Abl binding to Crk and increase Tyr<sup>222</sup> phosphorylation. On the other hand, by analysing a series of Crk C-terminal mutants, we describe an unusual mutant, Crk  $\Delta 242_{[EL]}$ , characterized by a disruption in the SH3 linker/C-terminal SH3 domain boundary that results in FAK activation, the tyrosine phosphorylation of FA proteins p130<sup>cas</sup> and paxillin, and increased numbers of focal adhesions in fibroblasts. These results are consistent with the proposed negative regulatory role of the Crk C-terminus, and suggest that the C-terminal region of Crk may contribute to the regulation of distinct tyrosine kinase pathways involving Abl and FAK.

Based upon the series of Crk mutants used in this study, our data suggest that Crk utilizes two distinct regulatory mechanisms to bidirectionally regulate focal adhesion signaling. On the one hand, Crk can transmit focal adhesion signals by conventional SH2/SH3 domain coupling, in which the Crk SH2 domain binds tyrosine phosphorylated focal adhesion proteins (e.g, p130 cas and paxillin) and propagates signals through proteins such as C3G, DOCK180, and Abl, that bind to the Crk N-terminal SH3 domain. Additionally, as shown here, c-Crk may also feedback and turn off signals that activate FAK by a mechanism under negative regulation by the C-terminal SH3 domain and the SH3 linker region.

Given that current models predict that integrin-mediated adhesion and migration along the extracellular matrix is a dynamic process, requiring reversible tyrosine phosphorylation and dephosphorylation for continuous assembly and disassembly of focal contacts, we posit that molecules like c-CrkII that can regulate upstream and downstream signals in a dynamic equilibrium would be well suited to permit cyclical events required for focal adhesion turnover and plasticity. The capacity of Crk $\Delta 242_{[EL]}$  to induce hyperphosphorylation of FA proteins and stabilize FA structures is remarkably reminiscent of the phenotype observed in PTP-PEST<sup>(-/-)</sup> fibroblasts in which p130<sup>cas</sup>, paxillin, and FAK are also found in a hyperphosphorylated state, and focal adhesions in these cells are more numerous throughout the ventral surface of the cell. Functionally, this suggests that the C-terminal region of Crk may function to induce turnover of focal

adhesions, and our data are consistent with a Crk→PTP-PEST→FAK cascade that regulates focal adhesion phosphorylation, although the nature of the crosstalk between Crk and PTP-PEST is not clear.

In the present study, we have uncovered a potentially novel regulatory mechanism for Crk II that involves the SH3 linker region/ C-terminal SH3 domain. The results of this study and previous studies support the notion that c-Crk can have both positive and negative roles during FA signaling by regulating both the binding to, as well as affecting the tyrosine phosphorylation status of FAK, paxillin, and p130<sup>cas</sup>. To gain better understanding of the functions of Crk in focal adhesion signaling, it will be important to define proteins to which Crk C-terminal SH3 domains interacts as well as how the other domains modulate these interactions.

## 10. MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

A Crk adapter családba három fehérje, a CrkI, a CrkII és a CrkL tartozik. Ezek a molekulák SH2-SH3-SH3 doménszerkezetű adapter fehérjék, melyek fontos szerepet játszanak sok extracelluláris inger követő jelátviteli folyamatban. Szerkezetileg a c-CrkII fehérje (38-42kD fajtól függően) két SH3 és egy SH2, illetve az ezeket összekötő rövid linker régióból áll. Ez a linker régió és a C-terminális SH3 domén a CrkI fehérjéből hiányzik. A CrkII két SH3 csoportját összekötő rövid, 54 aminosav hosszú szekvencia prolinban gazdag és egy olyan aminosav motívumot tartalmaz ( $Y^{222}AQP$ ), melyben a tirozint a Abl kináz családba tartozó enzimek foszforilálják. A  $pY^{222}$  kötőhelyet jelent a molekula saját SH2 csoportjának és lehetővé teszi a molekulán belüli kapcsolódást. Ez a konformáció változás szabályozza a molekula más fehérjékkel történő kapcsolódását, represszálja a Crk-mediált jelátvitelt azáltal, hogy szterikusan megakadályozza az N-terminális SH3 domén kapcsolódását a többi jelátvivő fehérjével. Az SH2 domén a pTyr-X-X-Pro csoportot tartalmazó fehérjékkel ( $p130^{cas}$  and paxillin), míg az N-terminális SH3 domén a Pro-X-X-Pro-X-Lys csoportot tartalmazó molekulákkal (C3G, Rap1 GTPáz fehérje specifikus guanin nukleotid exchange faktor, DOCK180, a Rac1 GTPáz működését szabályzó fehérje és tirozin kináz c-Abl) lép kölcsönhatásba.

A Crk fehérje szerepe a sejtet ért külső ingerek által aktivált szignálutakban igen sokrétű, magában foglalva a növekedési faktorok (NGF, EGF), mitogén lipidek, citokinek által aktivált, a T és B sejt receptor aktivációt, valamint extracelluláris matrix (ECM) adhéziót követő jelátviteli folyamatokat. Ezen jelátviteli folyamatok legtöbbje a FA fehérjék, a  $p130^{cas}$  és a paxillin foszforilációját okozza, kapcsolva ezáltal a Crk és SH3 kötő partnereit a citoszkeletonhoz, ahol a különböző helyről érkező jelek összegződnek. A  $p130^{cas}$ /Crk komplex a DOCK180 effektor fehérjén keresztül aktiválja a Rac GTPázt, s ezáltal „molekuláris kapcsolóként” működik az aktin polimerizációban és a sejtmozgásban. A Crk mind a C3G fehérjén, mind a DOCK180/Rac komplexen keresztül résztvesz a c-Jun  $NH_2$ -terminális kináz (JNK) aktivációjában. Több irodalmi adat támasztja alá azt a tényt, hogy a Crk egy

viSSzacsatoló mechanizmuson keresztül aktiválhatja a FAK-t. A v-Crk transzformált sejtekben az onkogén Crk emeli a FA fehérjék foszfortirozin szintjét és a FAK aktivitását. Mindez azt mutatja, hogy a Crk mind a FAK előtti, mind a FAK utáni jelátviteli jeleket befolyásolja.

A fehérje SH2 és N-terminális SH3 csoportjáról sok adat gyűlt már össze, beleértve a kölcsönható fehérjék azonosítását illetve az ezekhez kötött funkciót. Kérdéses azonban a C-terminális SH3 csoport és a SH3 doméneket összekötő linker régió szerepe, mivel nem sikerült még ezekkel a régiókkal kölcsönható fehérjéket azonosítani. Kísérleteink célja az volt, hogy a C-terminális régió szerepét minél jobban megértsük. Különböző, a C-terminális SH3 domént és a linker régiót érintő mutánszt állítottunk elő és vizsgáltuk a tirozin kináz jelátviteli folyamatban betöltött szerepét. A C-terminális mutánsok (CrkW276K, CrkY222F, CrkI és a Crk $\Delta$ 242) mind emelték az N-terminális doménhez kötött c-Abl kináz mennyiségét és ezzel párhuzamosan a Crk Tyr<sup>222</sup> foszforilációt. A deléciós mutánsokkal végzett kísérletek a fehérjének egy, a FAK aktivációjában szerepet játszó szegmentjének szerepére is rávilágítottak. Ezek a mutánsok, a Crk $\Delta$ 255 (C-terminális SH3 domén deléción) és a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> (Crk $\Delta$ 242 extended linker), melyeket a linker régió/C-terminális SH3 domén határ megváltozott szerkezete jellemez, a FA komplexben jelenlévő fehérjék, a FAK, a paxillin és a p130<sup>cas</sup> erős hiperfoszforilációját okozták. A Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> mutáns ezen felül nagymértékben emelte az NIH3T3 fibroblaszt sejtek FA komplexeinek számát. A Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> hiperfoszforilációt indukáló hatását mind a PTP-PEST, mind a domináns negatív c-Src túltermelődése ellensúlyozta. Nem volt ilyen hatással azonban sem a PTEN foszfataáz, sem a domináns negatív c-Abl.

Eredményeink azt mutatják, hogy a Crk C-terminális régiója szabályzó szerepet játszhat mind az Abl mind a FAK mediált tirozin kináz szignál utakban. Ez megfelel az irodalomból már ismert adatnak, miszerint a Crk C-terminális régió feltételezhetően negatív reguláló szerepet tölthet be.

Kérdéses, hogy a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> milyen módon emeli a FAK pTyr<sup>397</sup> szintjét, hiszen a mai napig nem sikerült a C-terminális SH3 doménnel vagy a linker régióval kölcsönható effektor fehérjét azonosítani. A linker régió 53 aminosavja közül 9 prolin, melyek közül néhány homológiát mutat SH3 domén kötő fehérjék



kapcsoló szekvenciájával és felveti a lehetőségét a linker régió belüli önálló SH3 kötő régió létezésének. Bár a linker régió belül nem fordul elő bizonyítottan Crk-SH3 kötő szekvencia (Pro-X-X-Pro-X-Lys), arra is van irodalmi adat, hogy az Abl és Src családba tartozó tirozin kinázok SH3 doménje és egy egyedülálló prolin csoport közötti kölcsönhatás autoinhibitor modulként funkcionál. Szerkezeti és biokémiai vizsgálatok mutathatják meg azt, vannak-e olyan specifikus motívumok a linker régióban, melyek direkt módon kapcsolódnak az N- vagy a C-terminális SH3 doménhez, illetve hogy a specifikus prolin szubsztitúciók a linker régióban befolyásolják-e a FAK aktivációt, vagy az Abl-Crk kölcsönhatást. A C-terminális mutánsok, Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub>, CrkW276K, CrkY222F és a splice variáns CrkI-t mind nagyobb mennyiségű Abl kinázt kötöttek a kontrolhoz képest. Ezzel jól korrelált a mutáns fehérjék magas pTyr<sup>222</sup> szintje, mely arra enged következtetni, hogy a C-terminális SH3 domén/linker régió visszahajolva szterikusan gátolja az N-terminális SH3 domén/Abl kináz kölcsönhatást, megakadályozva ezzel az Abl mediált Tyr<sup>222</sup> foszforilációt. Irodalmi adatok támasztják alá, hogy a Crk Tyr<sup>222</sup> foszforilációja konformáció változást okoz a fehérje N-terminális részén gátolva mind az SH2, mind az N-terminális SH3 mediált kölcsönhatásokat.

A Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> mutánssal végzett kísérletek azonban azt mutatják, hogy a C-terminális rész szerepe a FAK jelátviteli út pozitív szabályozásában független az Abl kináz CrkY<sup>222</sup> foszforilálásában betöltött szerepétől. Ezt a következő tények támasztják alá: 1. a kináz hiányos AblK295M nincs hatással a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> mediált FAK és p130<sup>cas</sup> hiperfoszforilációra. 2. a PTP-PEST overexpressziója blokkolta a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> indukált FAK foszforilációt, viszont nem volt hatással a Crk Tyr<sup>222</sup> foszforilációra. 3. a különböző C-terminális mutánsokhoz asszociálódó Abl kináz mennyisége nem korrelált az FAK és a FA fehérjék magas foszforiláltsági szintjével. Eredményeink alapján az feltételezhető, hogy a Crk adapter fehérje két külön szabályzó mechanizmuson keresztül mindkét irányba befolyásolja a FA jelátvitelt. Egyrésztől fokál adhéziós jelet közvetít az SH2/SH3 domén kapcsolódáson keresztül azáltal, hogy SH2 doménjével a foszforilált FA fehérjékhez kapcsolódik, N-terminális SH3 doménjén keresztül pedig a C3G, DOCK180 és Abl effektor molekulákat köti. Másrésztől a linker régió/C-terminális SH3 domén negatív reguláló szerepe miatt egy visszacsatoló

mechanizmussal szabályozza a FAK, paxillin és p130<sup>cas</sup> tirozin foszforiláltsági állapotát. A jelenlegi modellek szerint az integrin mediált adhézio és sejtmozgás dinamikus folyamat, melyhez a FA komplexek folyamatos „össze- és szétszerelődésére” és ezzel párhuzamosan folyamatos tirozin foszforilációra és defoszforilációra van szükség. A Crk és a hozzá hasonló molekulák, melyek a jelátvitel mindkét irányában képesek a jeltovábbítást szabályozni, pontosan illeszkednek ebbe a dinamikus folyamatba.

Az, hogy a Crk $\Delta$ 242<sub>EL</sub> a FA fehérjék, paxillin és p130<sup>cas</sup> hiperfoszforilációját okozza, valamint fokozza a FA komplexek stabilizációját összegyeztethető azzal a fenotípussal, melyet a PTP-PEST „knock out” fibroblaszt sejteken tapasztaltak. Ezekben a sejtekben a paxillin, p130<sup>cas</sup> és a FAK szintén hiperfoszforilált állapotban van, és a FA komplexek száma jóval nagyobb a normál sejtekhez képest. Mindez azt sugallja, hogy a Crk C-terminális régiója FA komplexek folyamatos „össze- és szétszerelődését” indukálja feltételezve egy Crk→PTP-PEST→FAK kaszkádfolyamatot. A Crk és PEST közötti molekuláris kommunikáció mikéntje nem tisztázott. A Crk pY<sup>222</sup>AQP motívum nem bizonyult a PTP-PEST számára preferált szubsztrátnak. Kérdéses az, hogy melyik sejtben belüli foszfátáz játszik szerepet a pTyr<sup>222</sup> defoszforilációjában.

Folyamatban vannak azok a kísérleteink, melyek kéthibrid technika segítségével próbálnak új, a C-terminális SH3 doménnel kölcsönható fehérjéket azonosítani. A Crk fehérjének a jelátvitelben betöltött pontos szerepére a továbbiakban molekuláris szerkezeti vizsgálatok illetve olyan fehérjék azonosítása és funkciójuk tisztázása deríthet fényt, melyek a Crk fehérjével, elsősorban a C-terminális régióval lépnek kölcsönhatásba.

## 11. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. László G. Puskás, **Ágnes Zvara**, László Hackler Jr. and Paul Van Hummelen. (2001.) Comparision of different sample amplification methods for microarray gene expression analysis. *Analytical Biochemistry (Submitted)*
2. **Ágnes Zvara**, J. Eduardo Fajardo, Marcela Escalante, Graham Cotton, Tom Muir, Kathrin H. Kirsch and Raymond B. Birge (2000.) Activation of focal adhesion kinase signaling pathway by structural alterations in the carboxyl-terminal region of c-CrkII. *Oncogene, Vol. 20, 951-961.*
3. Laurence Leconte, Olivier Semonin, **Ágnes Zvara**, Sylvie Boisseau, Chantal Poujeol, Jean-Pierre Julien and Michel Simonneau. (1994).Both upstream and intragenic sequences of the human neurofilament light gene direct expression of *lacZ* in neurons of transgenic mouse embryos. *Journal of Molecular Neuroscience, Vol. 5, 273-295.*

### Referált nemzetközi folyóiratban megjelent absztrakt:

1. **Ágnes Zvara**, Laurence Leconte, Olivier Semonin and Michel Simonneau. (1996.) Regulation of expression of human neurofilament light gene by upstream and homologous intragenic sequences during neuronal development in transgenic mouse embryos. *Cell Biology International, Vol. 20, 226.*

### Nemzetközi konferenciákon szereplő absztraktok:

1. Laurence Leconte, Olivier Semonin, **Ágnes Zvara**, Sylvie Boisseau, Chantal Poujeol, R. Kado and Michel Simonneau. (1995). Both upstream and intragenic sequences of the human neurofilament light gene direct expression of *lacZ* in neurons of transgenic mouse embryos. *Soc. Neurosci. Abst. Vol. 21. Part 2.#332.10.*

2. Simonneau, M., Sántha, M., Zákány, J., **Zvara, Á.**, Kalmár, T., Mas, C., and Raskó, I. 1996. Analysis of the function of neuronal intermediate filaments in mammalian embryos by targeting mouse peripherin gene. In *Abstracts of Society for Neuroscience. 26th annual meeting. Abst. No.378.12.*